

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación del efecto biológico de la concentración de
"CMU" en hojas de plantas cultivadas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Regina Revilla Pedreira

DIRECTOR:

Jesús Fernández González

Madrid, 2015

Regina Revilla Pedreira

TP
1981
016



X-53-272139-1

EVALUACION DEL EFECTO BIOLOGICO DE LA CONCENTRACION

DE "CMU" EN HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© Regina Revilla Pedreira
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-42311-1980

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**EVALUACION DEL EFECTO BIOLOGICO
DE LA
CONCENTRACION DE "CMU" EN
HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS**

**POR
REGINA REVILLA PEDREIRA**

MEMORIA

**PRESENTADA PARA ASPIRAR AL
GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA**

**JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR
MADRID, MAYO 1980**

Ponente: Sr. Dr. _____

TRIBUNAL *Presidente: Sr. Dr.* _____

Vocal: Sr. Dr. _____

Vocal: Sr. Dr. _____

Vocal: Sr. Dr. _____

Secretario: Sr. Dr. _____

EVALUACION DEL EFECTO BIOLOGICO DE
LA CONCENTRACION DE "CMU" EN HOJAS
DE PLANTAS CULTIVADAS



EVALUACION DEL EFECTO BIOLOGICO DE LA CONCENTRACION
DE CMU EN HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS

Memoria que presenta la licenciada Regina Revilla Pedreira para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia.



Director:

Prof. Dr. D. Jesús Fernández González

Ponente:

Prof. Dr. D. Juan Barceló Coll

Juan Barceló Coll
- 01/

Licenciada:

Regina Revilla Pedreira.
Aspirante al Grado de Doctor
en Farmacia.

Regina Revilla

Madrid, 23 de Mayo de 1980



MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR

D. Jesús Fernández González, Jefe del Grupo de Biosíntesis
de la División de Isótopos de la Junta de Energía Nuclear,

CERTIFICA: Que Dña. REGINA REVILLA PEDREIRA,
licenciada en Farmacia, ha realizado en este Laboratorio
de Biosíntesis de la JEN, el trabajo experimental de su
TESIS DOCTORAL, para su presentación en la Facultad de
Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, titu-
lado "Evaluación del efecto biológico de la concentra-
ción de CMU en hojas de plantas cultivadas", encontrán-
dose, en la actualidad, en condiciones para su presenta-
ción.

Lo que certifico para sus efectos oportunos en
Madrid, a veintitrés de Mayo de mil novecientos ochenta.



Firmado: Jesús Fernández González



FACULTAD DE FARMACIA

Nº _____



D. JUAN BARCELO COLL, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD
DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA, como ponente del trabajo experimen
tal de Dña. Regina Revilla Pedreira, realizado en
la Junta de Energía Nuclear, bajo la dirección del
Prof. Dr. Jesús Fernández González, que la presen
te memoria reúne cumplidamente las condiciones exi
gidas para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Para que así conste, firmo este certifi-
cado en Madrid, a dieciséis de mayo de mil nove--
cientos ochenta.

Fdo.: Juan Barceló Coll

- I -



El presente trabajo ha sido realizado en el Grupo de Biosíntesis de la División de Isótopos de la Junta de Energía Nuclear.

Quiero aquí expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Jesús Fernández González, director de esta Tesis, cuya dimensión humana y científica ha constituido un estímulo, una ayuda y un ejemplo constante.

Al Prof. Dr. D. Juan Barceló Coll, ponente de esta Tesis, por su comprensión, ayuda, consejos, comentarios y corrección del texto.

A las autoridades de la Junta de Energía Nuclear, y en especial, al Dr. D. Manuel Quinteiro y al Dr. D. Agustín Tanarro, actual Director del Instituto de Estudios Nucleares, por las facilidades concedidas para realizar este trabajo.

A la Srta. M^a Jesús Chaves por el interés y cuidado puestos en la mecanografía del texto.

A los Sres. D. José Luis Martín Guinea y Ramiro Español por la delineación de las figuras.

A los compañeros de laboratorio y en especial a las Srtas. Pilar Mazón, Margarita Sanz y Pilar Soriano por su ayuda y colaboración.

Finalmente, al Servicio de Biblioteca y Documentación de la Junta de Energía Nuclear y a todo el personal técnico y auxiliar que ha contribuido a la realización de este trabajo.

- II -

Dedicatoria:

A mi familia

A mis maestros

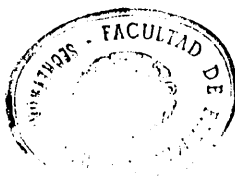
A mis amigos

<u>RESUMEN</u>	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
1.1. OBJETO E INTERES DEL TEMA	2
1.2. DESCRIPCION Y PROPIEDADES QUIMICAS DEL MONURON (CMU)	4
1.3. EFECTOS DEL CMU SOBRE LOS VEGETALES	8
1.3.1. Historia de su utilización como herbicida	8
1.3.2. Absorción y traslocación del CMU en plantas superiores	9
1.3.3. Efectos del CMU sobre la morfología y el desarrollo de las plantas	11
1.3.4. Efecto del CMU sobre la respiración y el metabolismo general de los vegetales	14
1.3.5. Efecto del CMU sobre la fotosíntesis	15
1.3.5.1. Descripción del proceso fotosintético	15
1.3.5.2. Efecto del CMU sobre la reacción de Hill	20
1.3.5.3. Efecto del CMU en la fotocarboxilación	22
1.3.5.4. Efecto del CMU sobre la actividad fotosintética de algas unicelulares ..	23
1.3.6. Metabolismo del CMU en vegetales.	26
1.3.7. Sensibilidad de las diferentes especies vegetales al CMU	30

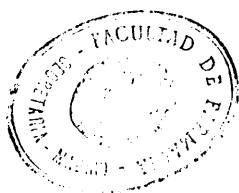
	<u>Página</u>
1.4. METODOS DE ANALISIS DE RESIDUOS DE CMU EN VEGETALES	36
1.4.1. Métodos químicos y físico-químicos	36
1.4.1.1. Espectrofotométricos ...	36
1.4.1.2. Cromatográficos	38
1.4.1.2.1. Cromatografía gas-líquido ...	38
1.4.1.2.2. Cromatografía en papel	40
1.4.1.2.3. Cromatografía en capa fina ..	40
1.4.1.2.4. Cromatografía líquido-líquido de alta presión	41
1.4.1.3. Otras técnicas analíti- cas	41
1.4.2. Bioensayos	42
1.4.2.1. Métodos que utilizan plantas completas	43
1.4.2.2. Métodos que utilizan el crecimiento raíz/tallo .	44
1.4.2.3. Métodos que utilizan algas	45
1.4.2.4. Métodos que utilizan otros organismos acuá- ticos	45
1.4.2.5. Métodos que utilizan hongos	46

	<u>Página</u>
1.4.3. Consideraciones sobre los métodos de análisis de residuos herbicidas	46
2. MATERIAL Y METODOS	49
2.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS CULTIVADAS	50
2.1.1. Especies vegetales ensayadas	50
2.1.2. Condiciones de cultivo	50
2.1.3. Observaciones realizadas	54
2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE LAS HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS	55
2.2.1. Estimación de la concentración de CMU en las hojas	55
2.2.2. Asimilación del $^{14}\text{CO}_2$	58
2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA REACCION DE HILL EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS ...	63
2.3.1. Aislamiento de cloroplastos	64
2.3.2. Determinación del contenido en clorofila	65
2.3.2.1. Area foliar específica .	67
2.3.2.2. Análisis de clorofilas .	67
2.3.2.3. En la suspensión de cloroplastos	68
2.3.3. Condiciones de la reacción	68
2.3.4. Obtención de los resultados	72

	<u>Página</u>
2.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA FOTOSINTESIS DEL ALGA CHLORELLA PYRENOIDOSA	74
2.4.1. Características del cultivo de Chlorella Pyrenoidosa	74
2.4.2. Método de cultivo utilizado	75
2.4.3. Normalización del contenido clorofílico de los cultivos para las determinaciones fotosintéticas ..	78
2.4.4. Utilización del electrodo de oxígeno en la determinación de la actividad fotosintética de una suspensión de Chlorella Pyrenoidosa	80
2.4.4.1. Fundamento del electrodo de oxígeno	80
2.4.4.2. Descripción del equipo .	83
2.4.4.3. Calibrado del equipo ...	86
2.4.4.4. Medida del desprendimiento de oxígeno en una suspensión de alga Chlorella Pyrenoidosa ..	90
2.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA	92
2.5.1. Preparación del extracto de hojas	92
2.5.2. Ensayo del efecto del extracto ..	92



2.5.3. Curvas de calibrado	93
2.5.4. Determinación de la concentra- ción de CMU en la hoja	93
3. RESULTADOS	94
3.1. EFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS CULTIVADAS	95
3.1.1. Absorción continua de CMU	95
3.1.2. Absorción durante una semana	95
3.2. EFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE LAS HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS	108
3.2.1. Concentración de CMU en las hojas	108
3.2.2. Asimilación del $^{14}\text{CO}_2$	120
3.3. EFECTO DEL CMU SOBRE LA REACCION DE HILL EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS	131
3.3.1. Relación superficie/peso de hoja y contenido en clorofila	131
3.3.2. Curva de calibrado de la relación DPIP oxidado/ DO_{540}	131
3.3.3. Condiciones de la reacción	134
3.3.4. Obtención de las funciones de correlación entre la capacidad fotorreductora de los cloroplas tos y la concentración de CMU ...	141
3.4. EFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA .	150



3.5. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA	153
3.5.1. Curvas de calibrado	153
3.5.2. Obtención de las funciones de correlación entre la actividad fotosintética y la concentración de CMU	161
3.5.3. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 24 horas	168
3.5.4. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 7 días	168
3.5.5. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 7 días con diferentes concentraciones de CMU y mantenidas la semana siguiente en solución nutritiva (sin CMU)	181
3.5.6. Estimación de la concentración de CMU en las hojas de plantas tratadas	188
4. DISCUSION DE RESULTADOS	196
4.1. EFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS	196
4.2. EFECTO DEL CMU SOBRE LA ABSORCION RADICULAR	201

	<u>Página</u>
4.3. EFECTO DEL CMU SOBRE LA FOTOSINTESIS ...	203
4.3.1. En hojas de planta completa	203
4.3.2. En cloroplastos aislados de hojas .	207
4.3.3. En Chlorella	215
4.4. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA FOTO- SINTESIS DEL ALGA CHLORELLA PYRENOIDOSA.	220
4.4.1. Curvas de calibrado	220
4.4.2. Evaluación de la concentración de CMU alcanzado en las hojas de plantas tratadas	224
4.5. PROPUESTA DE UN BIOENSAYO PARA EVALUAR RESIDUOS DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA A.F.	227
5. CONCLUSIONES	230
6. BIBLIOGRAFIA	233
ANEXO I : ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	254
ANEXO II : INDICE DE TABLAS	257
ANEXO III : INDICE DE FIGURAS	269



- X -



Resumen

En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto inhibitor del monurón o CMU (3-(p-clorofenil)-1,1 dimetil urea), sobre la actividad fotosintética de seis especies de plantas superiores (cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate) y sobre el alga unicelular *Chlorella pyrenoidosa*. En las plantas superiores, se ha estudiado el proceso de absorción radicular del CMU utilizando CMU-¹⁴C como trazador y se ha determinado el efecto de diversas concentraciones de este herbicida sobre la asimilación fotosintética del CO₂ por las hojas. También se ha estudiado el efecto inhibitor del CMU sobre la reacción de Hill en fragmentos de cloroplastos aislados de las hojas de las respectivas plantas. Los resultados indican que existe una correlación entre la concentración del herbicida y el grado de inhibición de la fotosíntesis para concentraciones comprendidas entre 10⁻⁸ M y 10⁻⁴ M.

En las plantas superiores, se ha estudiado, además, el efecto de la absorción radicular de distintas concentraciones de CMU durante cuatro semanas sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como la capacidad de detoxificación de las distintas especies tras la absorción de diversas concentraciones de CMU.

También se ha estudiado el efecto inhibitor del CMU sobre el desprendimiento de O₂ en suspensiones de *Chlorella pyrenoidosa* sometidas a iluminación. Los resultados muestran que, utilizando el método polarográfico para la medición del O₂, se pueden detectar concentraciones de CMU variables comprendidas entre 10⁻¹⁰ M y 10⁻⁴ M.

Como consecuencia de este trabajo, se propone un bioensayo para la detección de residuos de productos inhibidores de la fotosíntesis, utilizando como elemento sensor el alga *Chlorella pyrenoidosa*.

1. INTRODUCCION

1.1. OBJETO E INTERES DEL TEMA.

Entre los compuestos químicos que se utilizan en la agricultura moderna por sus propiedades herbicidas, destacan por su importancia aquéllos que afectan a la actividad fotosintética de los vegetales. Como es sabido, la sensibilidad de las diversas especies vegetales ante los productos herbicidas es diferente y depende, entre otros factores, de las características anatómicas y fisiológicas de aquéllas.

El grupo de herbicidas de las "ureas sustituidas" es uno de los que se caracterizan por su efecto inhibidor de la fotosíntesis y concretamente, el monurón, CMU 6 3-(p-clorofenil)-1,1-dimetil urea), que fué el primero de los productos de este grupo en que se apreciaron estas propiedades (Bucha y Todd, 1951), y que ha sido ampliamente utilizado en estudios básicos sobre fotosíntesis (Ashton y col., 1961; Calvin y Bassham, 1962; Ginegras y Lemasson, 1963, 1965), sirve perfectamente como representante de un amplio grupo de compuestos herbicidas que ejercen su acción por inhibición de la actividad fotosintética de los vegetales.

En el presente trabajo se estudia el efecto de diversas concentraciones de CMU sobre el crecimiento y desarrollo de seis especies cultivadas elegidas entre las Dicotiledóneas (judía y tomate) y las Gramíneas (cebada, avena, trigo y maíz), así como los aspectos fisiológicos relacionados con la absorción radicular de este producto y su efecto sobre la asimilación fotosintética del CO₂. Utilizando CMU marcado con ¹⁴C, se trata de evaluar la concentración que alcanza el herbicida en el limbo foliar en función de la concentración que tenía en la solución nutritiva de la que era absorbido por las raíces. De esta manera, se intenta corre-



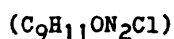
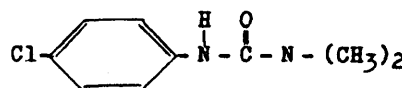
lacionar el poder inhibidor de las diversas concentraciones del compuesto, con la actividad fotosintética de los cloroplastos in vivo. Por medio de estos estudios, se puede deducir el diverso comportamiento fisiológico de las distintas especies consideradas en este trabajo.

En otra serie de experimentos, se trabajará con fragmentos de cloroplastos aislados de las hojas de las mismas especies vegetales y se estudiará el efecto inhibidor del CMU sobre la reacción de Hill o capacidad reductora de estos fragmentos a la luz.

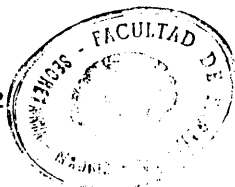
Por medio de estas experiencias se pretende establecer la posible correlación existente entre los efectos que se observan "in vitro" e "in vivo" por efecto del CMU sobre la actividad fotosintética en ambos casos. También con el estudio del efecto del CMU sobre la reacción de Hill en cloroplastos aislados, se pretende evaluar la posibilidad que ofrece este método para servir de bioensayo en la detección de residuos de herbicidas inhibidores de la reacción de Hill.

En otra serie de experiencias se estudiará la respuesta del alga *Chlorella* ante diversas concentraciones de CMU, evaluando el desprendimiento de O_2 de esta alga como consecuencia de su actividad fotosintética. La finalidad de este trabajo radica en estudiar los niveles de sensibilidad que ofrecería un bioensayo basado en la utilización de este microorganismo como sensor de compuestos inhibidores de la fotosíntesis, para aplicarlo, en la práctica, al análisis de residuos de este tipo de compuestos en productos vegetales o en suelos que, como se sabe, pueden constituir un importante problema, tanto desde el punto de vista ecológico como económico.

1.2. DESCRIPCION Y PROPIEDADES QUIMICAS DEL MONURON (CMU).



3-(clorofenil)-1,1-dimetilurea P.M.198,7



Caracteres: Polvo blanco que cristaliza del metanol en forma de prismas rectangulares muy finos. Olor característico.

pH: El pH de la solución acuosa es ligeramente ácido.

Punto de fusión: 170,5-171,5°C, según Bucha y Todd (1951)

Presión de vapor: Es de 5×10^{-3} mm de Hg si se determina a 25°C y de $3,4 \times 10^6$ mm de Hg si se determina a 50°C.

Valoración: Una solución metanólica de CMU al 1% presenta un máximo de absorción en el u.v. a 247 nm.

Solubilidad: Es poco soluble en disolventes polares y muy poco soluble en aceites y agua. La solubilidad en p.p.m. en distintos disolventes, según la firma Du Pont de Nemours, viene expresada en la Tabla I.

TABLA I. Solubilidad del CMU en diferentes disolventes

Disolvente	Temperatura (°C)	Solubilidad (p.p.m.)
Acetona	27	52.000
Benceno	27	2.900
Estearato de Butilo	27	1.500
Aceite de semi- lla de algodón	27	1.100
Aceite diesel nº 3	25	230
Agua	25	230

Identificación: Cromatografía en capa fina.

Soporte: Placas de Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck
20 x 20; 0,25 mm.

Fase móvil:

I: Cloroformo, Nitrometano 1:1
(v/v)

II: Hexano, Acetona 3:1
(v/v)

Recorrido: 15 cm.

Tiempo de elución:

I: 1 hora

II: 4 horas

Concentración: 20 µl de solución metabólica
de CMU al 1%.

Revelador: Luz u.v. de 254 nm. Se observa
fluorescencia amarilla sobre
fondo violeta.

R_f:

I: 0,54

II: 0,27



Estabilidad: Es estable a la oxidación y a la hidrólisis en condiciones normales de conservación, pero, a elevadas temperaturas, puede hidrolizarse, propiedad que puede utilizarse para su análisis químico (Lowen y col., 1964).

Se degrada por la luz.

No es inflamable ni corrosivo.

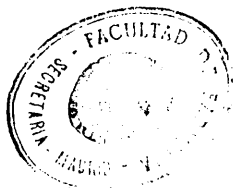
Toxicidad: Es baja en mamíferos. La DL₅₀ en ratas es de 3,5 g por Kg de peso. No irrita la piel ni produce reacciones alérgicas (Hodge y col., 1958).

Presentación: Dada su poca solubilidad en el agua, este producto se encuentra en el comercio en forma de polvos mojables (50-80%).

Conservación: Al abrigo de la luz.

Usos: Se utiliza, a dosis elevadas, como esterilizante del suelo en áreas no cultivables y a dosis más bajas, como herbicida selectivo de preemergencia en cultivos de espárragos, aguacates, vid, cebolla, algodón, cítricos, piña y caña de azúcar (Day, 1955).

Dosis: De 15 a 40 Kg/ha para erradicación de plantas perennes.
De 5 a 10 Kg/ha para las anuales. Como herbicida selectivo en preemergencia, de 0,5 a 2 Kg/ha.



1.3. EFFECTOS DEL CMU SOBRE LOS VEGETALES.

1.3.1. Historia de su utilización como herbicida.

La erradicación de las malas hierbas es un problema que siempre ha preocupado al hombre. Desde muy antiguo se han aplicado diversos sistemas para evitar o disminuir al máximo su aparición y desarrollo en los cultivos de especies vegetales de interés humano o en áreas no cultivables de interés público o privado (vías de comunicación, conducciones petrolíferas, edificaciones, etc.).

A finales del siglo pasado, se empezaron a utilizar para este fin los sulfatos de amonio y de diversos metales pesados como Zn y Fe entre otros.

El desarrollo de la síntesis química en el segundo tercio de este siglo contribuyó a un avance importante en el tratamiento de las malas hierbas. El primer producto orgánico de síntesis utilizado como herbicida fue el DNOC ó 2-metil-4,6-dinitrofenol en el año 1932. Diez años más tarde, Zimmerman y Hitchcock (1942) descubrieron las propiedades del 2-4-D como regulador del crecimiento vegetal y, a partir de este momento, se sintetizaron numerosos compuestos orgánicos y se ensayaron sus propiedades herbicidas.

Los trabajos de Thomson y col. (1946) sobre los efectos herbicidas de las fenilureas sustituidas atrajeron la atención de Bucha y Todd (1951), que emplearon por primera vez el monurón. Este compuesto había sido sintetizado un año antes en los laboratorios de la Sociedad Du Pont de Nemours (EEUU) sin que hubiera dado un resultado satisfactorio en el estudio farmacológico con vistas a su utilización como medicamento en veterinaria (coccidiosis del pollo).



La selectividad de este herbicida a dosis baja y su efecto esterilizante sobre bacterias y hongos a dosis más elevada, fueron descritos por McCall (1952), contribuyendo con sus trabajos a su amplia difusión.

En la actualidad, su importancia como herbicida selectivo ha ido decayendo ante la aparición en el comercio de otros numerosos compuestos. Se sigue utilizando como control de preemergencia en cultivos de algodón, caña de azúcar, piña tropical y espárrago a concentraciones de 1 a 5 Kg/ha (Brian, 1976).

La contribución más importante sobre su mecanismo de acción se debe a las investigaciones de Cooke (1956) y Wessels y Van der Veen (1956) que describieron su efecto inhibidor sobre la reacción de Hill.

Numerosos científicos han utilizado este compuesto para el estudio de los aspectos fundamentales del mecanismo de transferencia electrónico, en la fotosíntesis entre los que cabe destacar a Jagendorf y Avron (1959), Sweetser y Todd (1961), Ashton y col. (1961), y Gingras (1966) entre otros. Actualmente, este compuesto es muy utilizado en investigaciones básicas en fotosíntesis sobre el transporte electrónico entre el Fotosistema II (PS II) y el Fotosistema I (PS I) (Stuart y Gaffron, 1972 a, b; Sumida y Ueda, 1973; Ruraisnki, 1975 y Vierke, 1979).

1.3.2. Absorción y traslocación del CMU en plantas superiores.

Los herbicidas se pueden absorber vía radicular o foliar, dependiendo del modo de aplicación y de las características físico-químicas del producto. Una vez absorbido, debe ser traslocado hasta su lugar de acción para inducir una respuesta biológica, respuesta que dependerá de muchos factores, siendo los más importantes:

el estado de desarrollo de la planta, la longitud de las raíces (en el caso de absorción radicular), características de las hojas (para el caso de la absorción foliar), disponibilidad de nutrientes minerales en el suelo, y el metabolismo característico de cada especie vegetal.

El monurón se absorbe fácilmente por el sistema radicular y de allí es traslocado a las hojas, como han comprobado Bucha y Todd (1951) en experiencias realizadas en invernadero, y Mc Call (1952) y Haun y Peterson (1954) en sus trabajos en campo, observando que era más efectivo cuando se aplicaba en el suelo que por aplicación foliar.

El monurón puede absorberse también por hojas y estomas (Muzik y col., 1954, Pickering, 1965), aunque su efecto herbicida es mucho menor debido, principalmente, a que la traslocación a partir de la hoja es muy pequeña. Numerosos autores, entre los que se pueden citar a Crafts (1959, 1962, 1967), Crafts y Yamaguchi (1958, 1960), Fang y col. (1955), Leonard y col. (1966), Minshall (1954), Muzik y col. (1954), Pereira y col. (1963), Smith y Sheets (1966), Yamaguchi e Islam (1967), han estudiado la absorción y traslocación del monurón en una amplia variedad de especies vegetales, siendo la opinión unánime de que este herbicida se absorbe rápidamente por vía radicular y a una velocidad mucho menor por otros órganos, siendo traslocado casi exclusivamente por vía apoplástica.

Es preciso tener en consideración que el lugar de acción del monurón es el cloroplasto, y éste está rodeado de protoplasma, por lo que el herbicida debe atravesar el plasmalemma y el protoplasma hasta llegar al cloroplasto y, por tanto, además de una traslocación vía sistema apoplástico, tendrá que haber una pequeña traslocación vía simplasto. Según Ashton y Crafts (1973), dada la proximidad entre la pared celular y los cloroplastos, este movimiento podría realizarse por



una simple difusión pasiva.

Con respecto al proceso de absorción, existe una discrepancia entre distintos autores. Para Donaldson (1967), la absorción tendría lugar por simple difusión pasiva, siendo muy rápida durante la primera hora y estabilizándose a partir de este momento. Sin embargo, García (1972) y Sancho (1975), observaron que no existía una relación lineal entre las concentraciones de monurón acumuladas en las hojas y la concentración de monurón en la solución nutritiva, lo que explicaron como la evidencia de un transporte activo que hace aumentar la concentración del monurón en el jugo celular, incluso hasta diez veces la existente en la solución nutritiva.

Como resumen podríamos aceptar que el monurón se absorbe principalmente por vía radicular por un proceso de difusión pasiva y un transporte activo que depende de la concentración del herbicida en la solución nutritiva y es más evidente para bajas concentraciones del mismo, ya que, concentraciones mayores alteran el metabolismo normal de las células e impiden este tipo de transporte, se trasloca casi exclusivamente vía apoplasto, aunque debe atravesar el simplasto para llegar a su lugar de acción. Por vía foliar, la absorción es mucho menor y la traslocación, incluso en las condiciones más favorables, es muy pequeña.

1.3.3. Efectos del CMU sobre la morfología y el desarrollo de las plantas.

El monurón no parece actuar sobre el poder germinativo de las semillas, como se deduce de los trabajos de Mc Call (1952), pero sí sobre las plántulas una vez nacidas.

Diversos autores, entre los que podemos citar a



Christoph y Fisk (1954), Grant (1964) y Wu y Grant (1966) observaron que el CMU produce aberraciones cromosómicas e inhibe la división mitótica, siendo esta inhibición más intensa en el ápice del tallo que en los meristemas radiculares.

Sobre la planta completa, los efectos de este compuesto son más apreciables en los tejidos fotosintéticos. La primera descripción sobre los efectos fitotóxicos del CMU se debe a Bucha y Todd (1951), que observaron un envejecimiento prematuro de la parte marginal de las hojas con aparición posterior de una clorosis progresiva y un retardo del crecimiento, para finalizar con la muerte de la planta. Trabajando sobre planta completa, Minshall (1957) describe dos tipos de síntomas: uno "agudo" y otro "crónico". El primero se caracteriza por la aparición, a los tres o cuatro días de efectuado el tratamiento, de unas manchas necróticas en las hojas precedidas por el desarrollo de áreas de color verde claro. Para que aparezcan es necesaria una concentración foliar interna de 100 $\mu\text{g/g}$ de hoja fresca. El segundo se caracteriza por la aparición de unas manchas similares a las antes descritas, otras plateadas y otras grisáceas, marchitamiento de tallos y peciolo, amarilleamiento rápido, abscisión y clorosis parcial, estando estos síntomas específicos influenciados por la especie vegetal, las dosis administradas, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido después del tratamiento. Estos síntomas, en el caso "crónico", necesitan varios días para desarrollarse y aparecen a concentraciones foliares internas menores de 50 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

Se describen también por Ashton y Crafts (1973) dos tipos de clorosis, una rápida que recuerda al envejecimiento normal pero que aparece mucho antes y se localiza de preferencia en las proximidades de las venas

primarias, y otra parcial que afecta a la hoja completa. Se ha observado que los efectos tóxicos del monurón son más intensos cuando se favorece la transpiración de la hoja. Minshall (1960), al medir el agua perdida por las hojas de judía cuyos peciolos habían estado en una solución acuosa de monurón, observó que, para 15 mg de monurón por gramo de hoja fresca, se reducía la transpiración en un 50% con respecto a las hojas controles. El autor no pudo explicar bien este fenómeno, atribuyéndolo a una influencia directa sobre la apertura de los estomas más que al efecto del monurón sobre la fotólisis del agua. Investigaciones posteriores, Ashton (1965) y Detroux (1966), demostraron que el efecto del CMU sobre el crecimiento de las plantas no se debe a su posible influencia en el mecanismo de la transpiración.

Los tejidos no fotosintéticos también se ven afectados, de modo adverso, por este herbicida. El efecto del CMU sobre las raíces de diferentes especies vegetales ha sido estudiado por Muzik y col. (1954), Minshall (1960) y Voderberg (1961), comprobando que tiene un efecto directo tanto sobre la raíz intacta como sobre las escindidas, aunque éste es mayor y se manifiesta a menor concentración de herbicida cuando las raíces son clorofílicas como las del Hydrocharis morsus-ranae.

En tejido calloso no fotosintético de tabaco, Jordan y col. (1966) mostraron que este herbicida puede inhibir el crecimiento de otros órganos diferentes a las raíces por mecanismos en los que no interviene la fotosíntesis.

Podemos concluir, por tanto, que el CMU ejerce su efecto fitotóxico, de preferencia, en el tejido fotosintético de las plantas, observándose estos efectos tanto en tratamiento agudo como en crónico, y principalmente en las hojas, con aparición de manchas de

distintos tipos, clorosis y envejecimiento acelerado para continuar por marchitamiento de tallos y peciolo, abscisión y muerte prematura de la planta.

1.3.4. Efecto del CMU sobre la respiración y el metabolismo general de los vegetales.

Se han publicado muy pocos trabajos sobre el efecto del CMU en la respiración de los vegetales. Es de destacar el de Lotlikar y col. (1968) que demuestra que este herbicida puede inhibir, de modo apreciable, la fosforilación oxidativa a concentraciones comprendidas entre 10^{-2} M y 10^{-4} M, reduciéndose en un 40% aproximadamente la esterificación del fósforo inorgánico en hojas de repollo, mientras que la incorporación de oxígeno a las mitocondrias de la misma especie vegetal se reducía en aproximadamente un 20% en igualdad de condiciones.

En lo que respecta a su efecto sobre el metabolismo intermediario, existe también poca información, pero parece evidente que afecta de modo adverso a los niveles de producción de hidratos de carbono en las plantas, como se deduce de los trabajos de Cooke (1955) que observó un gran descenso del contenido de azúcares en las plantas tratadas con monurón. A similares resultados llegan Walsch y Grow (1971) utilizando especies seleccionadas de algas marinas como sustrato y diferentes concentraciones de diversos herbicidas derivados de la urea, encontrando que la inhibición llegaba a ser hasta del 60% e incluso superior en las especies más susceptibles.

Son de destacar también las investigaciones sobre la inhibición de la biosíntesis de lípidos complejos y sobre el conjunto de lípidos totales realizada por Sumida y Ueda (1973), en las que se observa que el



efecto inhibitor de este herbicida es también muy apreciable.

1.3.5. Efecto del CMU sobre la fotosíntesis.

El efecto del CMU sobre la fotosíntesis se descubrió poco después de sus propiedades herbicidas. A mediados de la década de los cincuenta (Wessels y Van der Veen, 1956) y principios de la de los sesenta (Ashton y col., 1961), comprobaron que las hojas de los vegetales perdían su capacidad de asimilar CO_2 cuando se trataban con CMU. Su efecto inhibitor sobre la reacción de Hill fue también estudiado por numerosos autores, entre los que podemos citar a Cooke (1956), Bishop (1958), Jagendorf y Avron (1959), Gingras y Lemasson (1963, - 1965), Rurainski (1975) y Vierke (1979), siendo la hipótesis más ampliamente aceptada la que afirma que el CMU inhibe la fotólisis del agua al bloquear el transporte de electrones entre los dos fotosistemas.

Dado que en nuestro trabajo, vamos a estudiar especialmente los efectos del CMU en el transporte electrónico a nivel de la reacción de Hill y de la fotocarboxilación, describiremos estos procesos con más detalle.

1.3.5.1. Descripción del proceso fotosintético.

El principal aporte de energía en la biosfera proviene de la conversión de la energía solar en energía química, que se realiza en los cloroplastos de algas y plantas verdes.

En los cloroplastos tienen lugar dos tipos de reacciones: unas luminosas y otras oscuras. En las primeras, se capta la energía luminosa que, a través de una serie de procesos, se utilizará en la formación de

ATP y poder reductor (NADPH) que, a su vez, serán utilizados en la fase oscura para reducir el CO_2 y transformarlo en hidratos de carbono. Para este fin, existen en los tilacoides de los cloroplastos pigmentos encargados de captar la luz que se encuentran agrupados en "unidades fotosintéticas" independientes denominadas fotosistemas. Parece ser que tanto en algas como en plantas superiores, existen dos tipos de fotosistemas, denominados I y II (PS-I y PS-II) que cooperan de forma secuencial en la transferencia de electrones desde el agua al NADP (Boardman, 1970). Ambos fotosistemas contienen clorofila a, clorofila b y carotenoides, pero en proporciones diferentes. Las clorofilas tienen dos máximos de absorción, uno en el rojo (entre 640 y 670 nm) y otro en el azul (entre 410 y 440 nm), mientras que los carotenoides absorben en la zona azul y verde (entre 410 y 500 nm).

Aunque no se conoce exactamente el número de moléculas que intervienen en un fotosistema tipo, la opinión más extendida, es la que admite que participan unas 250 moléculas de clorofila (a y b) y unas 50 de carotenoides.

La energía de los cuantos de luz que llega a las moléculas de los pigmentos que integran los fotosistemas produce una excitación de los electrones corticales, siendo el estado de excitación tanto mayor cuanto menor sea la longitud de onda de la radiación luminosa. La energía absorbida se transmite de unas moléculas a otras por resonancia, siendo de un 100% la eficiencia de la transmisión para las moléculas de clorofila y de un 40% para las de los carotenoides a la clorofila. El aceptor final de la excitación es una molécula de clorofila a (asociada probablemente a proteínas), que constituya el centro de reacción. En la figura 1 se representa, en forma de esquema en Z, el funcionamiento de los dos foto-

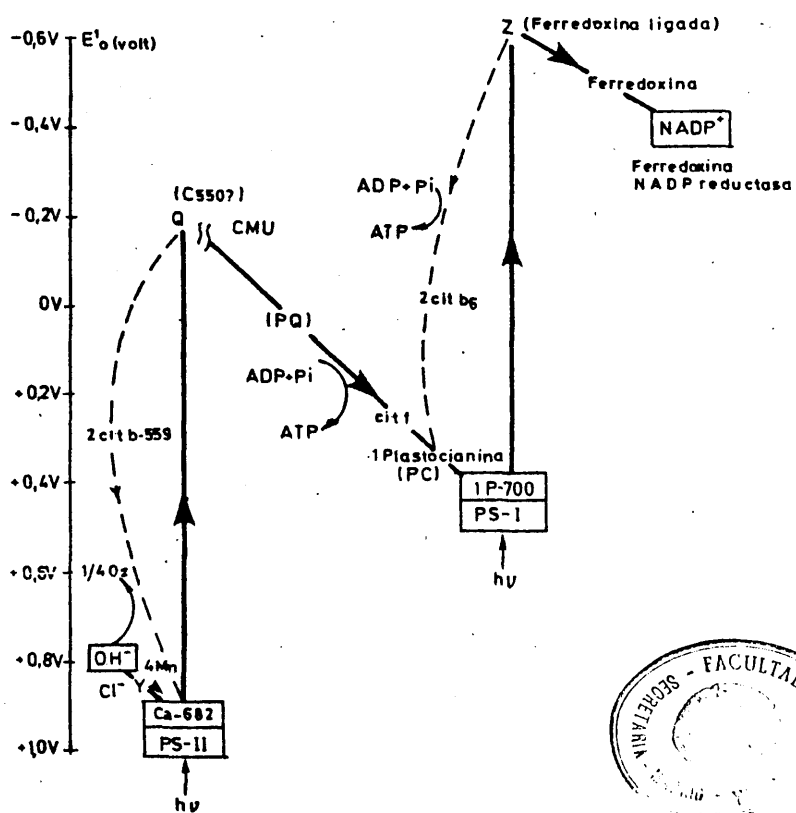


FIG.1
ESQUEMA EN Z DEL TRANSPORTE ELECTRONICO FOTOSINTETICO.
(TOMADO DE SMITH 1977)

sistemas que constituyen el aparato fotosintético de las algas y las plantas verdes.

En el PS-I, el centro de reacción está constituido por el P-700, que es una molécula de clorofila a que decrece en la absorción de la luz de 700 nm cuando se ilumina. Cuando el P-700 recoge la excitación de los pigmentos que lo acompañan en el PS-I, uno de los electrones corticales alcanza un potencial suficiente como para ser transferido a la ferredoxina (Fd), que es una proteína de bajo peso molecular (12.000 aproximadamente), transformándose en $P-700^+$, oxidante débil con un potencial de tipo medio del orden de -0.6 v. Según Beard y Malkin (1972), parece ser que el compuesto intermediario "Y" entre el P-700 y la ferredoxina soluble, es otro compuesto denominado "ferredoxina ligada" (bFd), que actúa como oxidante del P-700 en presencia de la luz. La ferredoxina reducida es capaz de reducir al nicotinadenín-dinucleótido fosfato (NADP) que, a su vez, con la ayuda de la energía suministrada por el ATP, es capaz de reducir el carbono carboxílico del ácido fosfoglicérico (PGA), que es la primera molécula en la que aparece fijado el carbono atmosférico.

El déficit de electrones creado en la molécula de P-700 es repuesto por otro fotosistema, el PS-II que, a su vez, toma los electrones de la molécula de agua (a través de un oxidante Z), liberándose oxígeno molecular. La oxidación del agua y el desprendimiento de una molécula de oxígeno requieren la absorción secuencial de cuatro cuantos y la acumulación de cuatro equivalentes de oxidación (Cheniae, 1970; Cheniae y Martin, 1973). El mecanismo por el cual se oxida el agua, todavía no se conoce, aunque está establecido que se necesita manganeso, probablemente en forma de complejo manganeso-proteína y Cl^- (Boardman, 1975 y Renger, 1978).

El centro de reacción del PS-II parece ser otra

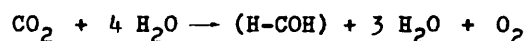


molécula especial de clorofila a, que absorbe a 682 nm (P-682) y que, al excitarse, transfiere un electrón a un compuesto fuertemente reductor que ha sido identificado como C-550 por Knaff y Arnon (1969), capaz de reponer los electrones al PS-I a través de una serie de transportadores tales como la plastoquinona (PQ) y la plastocianina (PC).

Debido a la caída de potencial existente en este transporte de electrones, se desprende energía que se aprovecha para fosforilar una molécula de ADP y crear un enlace rico en energía en forma de ATP que se utilizará posteriormente en la reducción del PGA. El déficit de electrones creado en el P-700 puede ser repuesto también a partir de la ferredoxina reducida a través de una serie de citocromos que, al devolver el electrón al P-700 cerrarían un ciclo análogo al que ocurre en las bacterias y, en la caída de potencial, se producirá ATP por la fosforilación del ADP (fosforilación cíclica) aunque no se produzca poder reductor.

Como resumen del proceso fotosintético, podemos decir que, a través de una serie de reacciones que ocurren en los cloroplastos, la energía luminosa es captada por los fotosistemas y almacenada en compuestos ricos en energía. En este proceso, se rompe la molécula de agua con liberación de O_2 y los electrones resultantes son elevados hasta un potencial suficiente para reducir a la molécula de CO_2 , gastando parte del ATP formado en el proceso fotosintético.

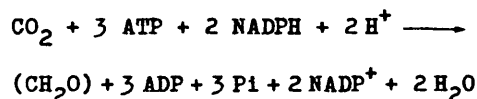
Se pueden distinguir, por tanto, dos tipos de reacciones: unas, en las que interviene la luz, y la energía luminosa es utilizada en formar ATP y poder reductor (NADPH) y otro segundo tipo de reacciones, las oscuras, en las que los productos formados en las reacciones luminosas (ATP y NADPH) son utilizados para reducir el carbono fijado según la ecuación:



$$\Delta G = 114 \text{ Kcal}$$

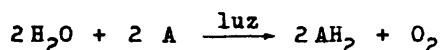
La incorporación del CO_2 atmosférico a la materia orgánica se realiza a través de las reacciones del ciclo de Calvin (Calvin, 1956, 1962; Calvin y Bassham, 1962), en el que la molécula aceptora de CO_2 es la ribulosa difosfato (RuDP), la cual, da origen a dos moléculas de PGA, que son reducidas a aldehído fosfoglicérico en una reacción que necesita dos moléculas de NADPH y de ATP. La regeneración de la RuDP se realiza a partir de las moléculas de triosa fosfato formadas, de tal manera que, de cada 6 triosa-fosfato producidas en la fijación de 3 moléculas de CO_2 por 3 moléculas de RuDP, una sola representa la ganancia neta de los tres átomos de carbono, utilizándose las cinco restantes en regenerar las tres moléculas de RuDP consumidas.

Por cada molécula de CO_2 fijada se requiere gastar 3 moléculas de ATP y 2 de NADPH para la reducción del carbono y la regeneración de la RuDP. En forma muy esquematizada, se podría resumir el proceso en la siguiente ecuación:



1.3.5.2. Efecto del CMU sobre la reacción de Hill.

En 1937, Hill observó que cuando se iluminaba una suspensión de cloroplastos de espinaca en presencia de un aceptor de electrones, se cumplía la siguiente ecuación que lleva su nombre:



Siendo A el aceptor de electrones y AH_2 su forma reducida. El proceso se puede cuantificar valorando ya sea el oxígeno desprendido o la cantidad de aceptor reducido (Hall y Rao, 1972). Como aceptor de electrones se pueden utilizar distintas sustancias, generalmente coloreadas, que interceptan el transporte de electrones desde el agua hasta el NADP^+ a distintos niveles de la cadena de transporte, siendo las más utilizadas el metilviológeno, la p-fenilenodiamina, el ferricianuro y el diclorofenolindofenol.

La inhibición de la reacción de Hill (Hill, 1939) por los herbicidas derivados de la urea, ha sido objeto de numerosas investigaciones, entre las que cabe citar las de Jagendorf y Avron (1959), Bamberger y col. (1963), Gingras y col. (1963), Homann y Gaffron (1963), Izawa y Good (1965), Izawa (1968), Makeyeva-Gur'yanova y Chkrikov (1968), Mc Mahon y Borograd (1968), Kylin y col. (1972), Sundberg y Kylin (1972) y Rurainski (1975). La mayoría de ellos sitúan el lugar de acción más probable para este tipo de herbicidas en el FOTOSISTEMA II y muy próximo al desprendimiento de O_2 . Sin embargo, Asahi y Jagendorf (1963) y Sargent y Taylor (1972), han demostrado que el CMU también puede inhibir el FOTOSISTEMA I, pero a concentraciones de herbicida muy superiores a las necesarias para inhibir el PS-II, y como éste le precede, no parece probable que sea un factor significativo en sus propiedades herbicidas. En los trabajos de Moreland (1967) y Moreland y Blackmon (1968), utilizando una suspensión de cloroplastos iluminados, agua como donador de electrones, DPIP como aceptor de los mismos y CMU como inhibidor de la reacción de Hill, se considera que el lugar de acción de este compuesto se puede

situar en el PS-II entre el compuesto Q y la plasto--quinona, hecho que se confirma al observar que aumenta la fluorescencia del PS-II, lo que hace suponer que Q se reduce completamente y pierde su capacidad de transferir un electrón al PS-I y al interrumpirse el transporte electrónico se impide la reducción del DPIP.

Se puede establecer una relación lineal entre el logaritmo decimal de la concentración de herbicida en el medio de reacción para valores comprendidos entre 10^{-4} M y 10^{-8} M y la inhibición de la reacción de Hill, como han comprobado Gingras y col. (1963) y Sancho (1975) utilizando cloroplastos aislados de espinaca y cebada respectivamente. García (1972), utilizando cloroplastos aislados de judía, avena, cebada, alfalfa y espinaca, encuentra que el poder inhibidor del CMU en la reacción de Hill depende, además de la concentración del herbicida, de la relación molecular CMU/clorofila y de la especie vegetal considerada.

1.3.5.3. Efecto del CMU en la Fotocarboxilación.

Como ya hemos indicado anteriormente, al inhibirse el transporte de electrones en la fotosíntesis, se impide la formación del poder reductor necesario para reducir el CO_2 y, en consecuencia, se impide la formación de hidratos de carbono con el consiguiente agotamiento de las plantas tratadas. Sancho (1975) estudia el efecto del CMU en la asimilación del $^{14}\text{CO}_2$ en plantas de cebada y observa que concentraciones de herbicida del orden de 10^{-4} M, incorporados en la solución nutritiva, la inhiben totalmente.

Diversos investigadores han comprobado que un suplemento exógeno de hidratos de carbono a plantas tratadas, retrasa los efectos tóxicos de algunos herbicidas derivados de la urea (Davis, 1966), pero no impiden

el daño cuando las hojas de la planta tratada son ya maduras, acelerándose incluso el proceso en presencia de la luz y siendo más acusado cuanto mayor es la intensidad de la misma (Minshall, 1957).

En resumen, se puede considerar que el efecto herbicida del CMU se produce por la inhibición del transporte electrónico y se puede situar su lugar de acción en un punto próximo al desprendimiento de oxígeno en el PS-II. Como consecuencia, se impide la formación del ATP y del NADPH, necesarios para la asimilación del CO_2 .

Sin embargo, hay autores que opinan que ésta no es la única causa que explique los síntomas fitotóxicos dependientes de la luz, y aunque no está comprobado, muchos consideran que además debe formarse una sustancia fitotóxica, todavía no identificada, próxima al lugar de liberación del oxígeno fotosintético (Moreland y Blackmon, 1968).

1.3.5.4. Efecto del CMU sobre la actividad fotosintética de algas unicelulares.

Los herbicidas derivados de la fenilurea, principalmente el CMU y el DCMU, han sido utilizados por numerosos investigadores para intentar esclarecer diferentes aspectos de la A.F. de algas unicelulares.

Merecen citarse, entre otros, los trabajos de Bishop (1958), Maloney (1958), Duysens y Ames (1962), Gingras (1966), Teichler-Zallen y Hoch (1967), Kylin y col. (1972), Sundberg y Kylin (1972), Stuart y Gaffron (1972a,b), Rurainski (1975) y Vierke (1979).

Utilizando CMU como inhibidor y *Chlorella Pyrenoidosa* como organismo fotosintético, Gingras (1966) estudió la inhibición del desprendimiento estacionario de O_2 en función de la intensidad luminosa, de la temperatura



y de la dependencia espectral y, a través de los cálculos cinéticos correspondientes, intentó explicar el lugar y el mecanismo de acción de este inhibidor. A continuación se detallan los resultados obtenidos por este autor:

a) Inhibición en función de la intensidad luminosa.

Si a una suspensión de Chlorella, iluminada con una intensidad de luz débil, se le adiciona CMU en una concentración del orden de 4×10^{-7} M, se produce una inhibición del desprendimiento de O_2 del 50%. Si la intensidad de la luz utilizada es fuerte, es preciso una concentración de CMU del orden de 2×10^{-6} M para obtener el mismo efecto (Gingras, 1966).

Esta diferencia de sensibilidad, en función de la intensidad luminosa, podría sugerir una actuación del inhibidor a dos niveles de sensibilidad diferentes, que pudieran deberse a una etapa fotoquímica o bien a una reacción térmica limitante (Gingras y col., 1963).

b) Inhibición en función de la temperatura.

En la hipótesis de una dualidad de lugares de diferente afinidad para el CMU, se podría suponer que, en función de la temperatura del medio, existiría un desplazamiento del equilibrio por formación de un complejo intermedio que actuaría como inhibidor biológico y sería diferente según el tipo de complejo formado, o bien que el inhibidor "per se" inactivara al mismo intermediario (p.ej.: un transportador de electrones), participando en reacciones diferentes.

Sin embargo, de los trabajos de Gingras (1966) se deduce que, tanto en ausencia como en presencia de CMU, la inhibición no presenta sensibilidad térmica y no



permite, por tanto, pronunciarse sobre la hipótesis de una dualidad de lugares de inhibición.

c) Dependencia espectral de la inhibición.

Como ya se comentó en el punto 1.3.5.1, los electrones procedentes de la hidrólisis del agua, en una primera etapa fotoquímica gobernada por el Fotosistema II (PS-II) sufren una caída de potencial electroquímico, liberando la energía almacenada en forma de ATP, siendo elevados al potencial suficiente para reducir al NADP en una segunda reacción fotoquímica ligada al Fotosistema I (PS-I).

Según la hipótesis de Krogmann (1958), posteriormente comprobada por Hill y Bendall (1959) y Losada y col. (1961), la fotofosforilación oxidativa es inhibida por el DCMU en cloroplastos aislados, pero puede evitarse, si se adiciona al medio triclorofenolindofenol reducido por un exceso de glutatión, ya que el déficit de electrones producido por la inhibición que ejerce el DCMU es compensado con los electrones que suministra el triclorofenolindofenol reducido.

Los derivados de la fenilurea, sólo bloquean la primera reacción fotoquímica y, por lo tanto, la segunda podrá continuar funcionando, siempre que exista un aporte exógeno de electrones a un potencial electroquímico adecuado.

Si las dos reacciones fotoquímicas son interdependientes, los productos de reacción de una serán necesarios para el funcionamiento de la otra, y la velocidad del conjunto estará determinada por la más lenta de ellas.

Según los trabajos de Gingras (1966), en que empleó la diferente dependencia espectral de los dos fotosistemas, para intentar explicar el lugar de acción del



CMU, se deduce que la acción de este derivado de la urea influye directamente sobre el transporte de electrones que tiene lugar entre el PS-II y el PS-I. Gingrass (1966) en sus experiencias, se basó en las conclusiones de Emerson (1958), según las cuales, longitudes de onda $> 690 \text{ nm}$ actúan como factor limitante para el desprendimiento de oxígeno.

Este autor, realizó sus experiencias con Chlorella y estudió la respuesta fotosintética de este organismo al CMU determinando el desprendimiento de O_2 por un método polarográfico.

En conclusión, podemos decir, que el CMU actúa sobre la A.F. de algas unicelulares, inhibiendo el desprendimiento de O_2 por bloqueo del transporte de electrones entre las dos fotosíntesis, impidiendo la recarga del sustrato del PS-I por PS-II.

1.3.6. Metabolismo del CMU en vegetales.

Hasta la fecha, son todavía escasos los estudios realizados a nivel bioquímico sobre las vías metabólicas de los herbicidas en los vegetales, así como sobre el mecanismo enzimático que interviene en el proceso biológico de su degradación. Si consideramos que el efecto fitotóxico de un herbicida está en íntima relación con sus procesos de degradación que regulan la cantidad de moléculas de producto sin transformar que alcanzan su lugar de acción y son capaces de ejercer la acción tóxica, comprenderemos la importancia de su conocimiento.

El primer estudio sobre el metabolismo de los herbicidas derivados de la urea, fue realizado por Fang y col. (1955) al aplicar carbonil- ^{14}C -CMU a hojas de judía y observar, por cromatografía en papel, el tiempo que

tardaba en formarse un complejo con el CMU y constituyentes normales de la celulosa que, por hidrólisis ácida, daban el herbicida sin transformar. Freed y col. (1961), informaron que este complejo estaba formado por el CMU y una proteína de bajo peso molecular o un péptido. - Sweetser (1963), trabajando con *Chlorellas* "in vitro", también observó la formación de un complejo entre el FMN y el CMU en presencia de la luz que inactiva el herbicida, hecho que todavía no ha sido comprobado en plantas superiores.

Sin embargo, el primer paso del proceso de degradación metabólica en los herbicidas derivados de la fenilurea, parece ser la N-dealquilación, dado que la eliminación de un grupo metilo en la urea dimetilada reduce su fitotoxicidad y por eliminación del segundo grupo metilo, ésta desaparece completamente, Axelrod (1956). El proceso se confirma por la aparición sistemática de los mismos productos de degradación en las diferentes plantas tratadas. En la tabla II se pueden observar los resultados obtenidos utilizando CMU marcado con ^{14}C en el anillo aromático en diferentes plantas y con distintas formas de aplicación.

La hidrólisis posterior de las ureas demetiladas hasta las anilinas correspondientes es difícil de observar en plantas pues, o no se llegan a detectar, o la concentración es muy pequeña, posiblemente por su rápida transformación por conjugación o por oxidación.

En experimentos de laboratorio, se ha comprobado que, tanto las hojas como las raíces e incluso los estomas de las plantas son capaces de producir la N-demetilación del CMU. En condiciones de campo, el lugar en que se verifique la degradación dependerá de la especie vegetal tratada y de la movilidad del herbicida en la planta. En el caso del CMU que es traslocado rápidamente

TABLA II.- N-dealquilación e hidrólisis del CMU-¹⁴C después de la aplicación del compuesto marcado a diferentes especies vegetales. (U=CMU sin transformar, M=derivado monometilado, D=derivado demetilado, A=anilina correspondiente, (A)=metabolito buscado pero no encontrado). Geissbühler, 1969.

Especie Vegetal	Modo de aplicación	Tiempo de exposición	Metabolitos reconocidos	Ref.
Algodón Soja	Solución nutritiva	Cinco días " "	U M, D ≥ A U > M, D (A)	Smith y Sheets (1967)
Algodón Plátano Soja Maíz	Discos de hoja incubados con solución del herbicida	8 horas	U < M, D ≥ A U, M, D ≥ A U, M ≥ D ≥ A U ≥ M > D, (A)	Swanson y Swanson (1968)

a las partes aéreas de las plantas, es de esperar que sea metabolizado de preferencia en las hojas.

En lo que respecta al mecanismo enzimático que interviene en los procesos de degradación del CMU en las plantas, se podría suponer que pudiera intervenir una ureasa, sustancia ampliamente distribuida en las plantas, pero Sumner y Somers (1953), examinando diversos substratos potenciales, entre los que figuraban el CMU y otras ureas sustituidas, no encontraron que se hidrolizaran por la ureasa.

El proceso de N-demetilación es una reacción enzimática oxidativa que requiere oxígeno y NADPH como cofactores (Brodie y col., 1958; Shuster, 1964). La velocidad de la reacción depende del tipo de sustituyentes nitrogenados no alquílicos. Hodgson y Casida (1961), al estudiar "in vitro" la dealquilación de un gran número de carbamatos, así como CMU y diurón, utilizando un sistema enzimático obtenido de microsomas hepáticos de rata, observaron que las ureas eran dealquiladas más lentamente que los carbamatos, posiblemente por su escasa solubilidad en el agua (Gaudette y Brodie, 1959), - aunque también podrían influir propiedades configuracionales o estructurales todavía no bien estudiadas.

En trabajos realizados "in vitro" por Posner y col. (1961) con el mismo sistema enzimático microsomal se encontró que también pueden producirse hidroxilaciones en el anillo. El proceso requiere también O_2 y NADPH además de la intervención de una oxidasa (Shuster, 1964). En animales, Ernst y Böhme (1965), Böhme y Ernst (1965), demostraron que en orina de rata, los metabolitos hidroxilados se eliminan principalmente como glucurónido y éter-sulfato y, dado que las plantas contienen una glucuronil-transferasa similar a la de los animales (Pridham, 1965), se puede suponer que si se forman metabolitos

hidroxilados "in vivo" pueden también ser conjugados - por las plantas en forma de glucurónidos.

En resumen, la vía de degradación propuesta para los herbicidas derivados de la urea, se podría esquematizar según se representa en la Fig. 2.

1.3.7. Sensibilidad de las diferentes especies vegetales al CMU.

Se ha observado que, cuando se aplica cualquier herbicida, en igual concentración a diferentes especies vegetales, se obtienen, en general, diferentes respuestas.

Como ya hemos indicado anteriormente, el herbicida debe alcanzar, a nivel celular, el lugar de acción en una concentración y durante un tiempo suficientes para ejercer su acción fitotóxica. El número y complejidad de los factores que intervienen en este proceso, así como la interacción entre ellos es tan grande, que es muy difícil estudiarlos por separado.

A grandes rasgos, se puede considerar que en las respuestas de diferentes especies vegetales a un mismo herbicida, intervienen fundamentalmente tres componentes: a) ambiental, b) estado de crecimiento de la planta, y c) genético.

La influencia del componente ambiental ha sido estudiada por Minshall (1957), comprobando la importancia del tipo de suelo, la ecología del ecosistema, la luz y la humedad relativa en la selectividad de la respuesta de diferentes especies vegetales a iguales concentraciones de CMU. Este autor observó que, además de los factores mencionados, tenía una gran influencia la estructura química del herbicida, la formulación

- 31 -

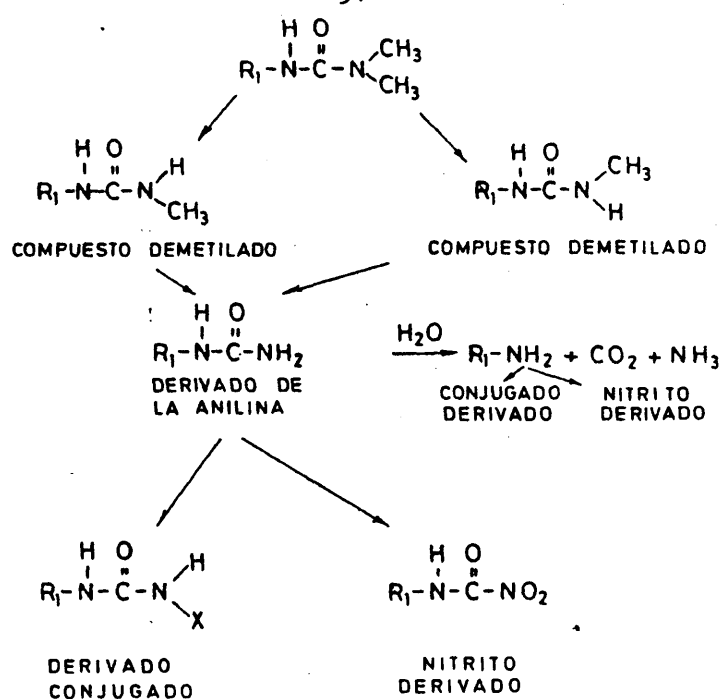


FIG. 2
POSIBLE VIA DE DEGRADACION DEL CMU EN PLANTAS
SUPERIORES. (R₁=p-CLOROFENILO).
TOMADO DE ASHTON Y CRAFTS (1973)

empleada, el portador utilizado y la técnica de aplicación.

La sensibilidad al CMU según el estado de desarrollo de diferentes especies vegetales ha sido estudiado por Steckó (1971) en guisantes, patata y trébol rojo, encontrando como factores importantes modificadores de la respuesta tanto la capacidad del herbicida para penetrar a la planta a través de los distintos órganos, como el mecanismo de acción del herbicida, es decir, su efecto sobre la planta madura en comparación con los órganos en desarrollo de la misma.

Sin embargo, es el componente genético el que condiciona esencialmente la sensibilidad de las diferentes especies vegetales a los herbicidas. Estos compuestos, actúan en la planta como un componente extraño y ésta debe desarrollar un mecanismo enzimático capaz de transformar el compuesto tóxico en otro de toxicidad menor o nula. El desarrollo del mecanismo enzimático requiere un período de inducción previo y de la capacidad y velocidad para ponerlo en marcha va a depender, en gran medida, la selectividad de las diferentes especies al CMU.

En resumen, podemos decir que los factores que determinan el grado de respuesta, una vez absorbido el CMU por las diferentes plantas, son múltiples y, cabe destacar la capacidad de retención del herbicida por la planta, la facilidad con que se trasloca a los tejidos, y su estabilidad y actividad potenciales una vez alcanzado el lugar de acción, factores que estarán a su vez condicionados por las características físico-químicas del herbicida, y por la capacidad de la especie vegetal para metabolizar, generalmente por más de una vía diferente, el compuesto químico extraño para convertirlo en uno menos tóxico o atóxico.

- 33 -

A fines prácticos, se indican en la tabla III los principales cultivos en los que se utiliza el CMU como herbicida, así como la dosis y forma de aplicación empleadas, y en la tabla IV se indica la sensibilidad a este herbicida de algunas especies vegetales consideradas como malas hierbas en algunos cultivos.



TABLA III.- Principales plantas cultivadas en las que se utiliza el CMU como herbicida. (Thomson, 1972; Weed Control, 1971; Detroux y Gostinchar, 1967).

Especie vegetal	Dosis (Kg/ha)	Epoca de aplicación	Malas hierbas controladas	Observaciones
Algodón	0,9 - 1,35	Cuando el algodón tiene 30 cm de alto.	La mayoría de las malas hierbas anuales y las gramíneas.	No pulverizar sobre el algodón.
Espárrago	0,9 - 9	Antes de que aparezcan las malas hierbas, pero no antes de las 4 semanas previas a que egerje el espárrago ni después del periodo de corte.	La mayoría de las malas hierbas de hoja ancha y las gramíneas.	Aplicarlo sólo una vez por estación. No aplicar a los espárragos recién sembrados.
Caña de azúcar	9	Inmediatamente después de la plantación en la caña nueva o después del corte y preparación del suelo en la caña vieja o de "boce".	La mayoría de las malas hierbas anuales.	Se deben hacer una 2ª o 3ª aplicación entre las hileras de caña.
Piña	4,5	Antes de la emergencia de las malas hierbas pero una vez agotada la cosecha.	La mayoría de las malas hierbas anuales.	Los tratamientos interlineares deben hacerse durante la estación.
Citricos	3 - 4	Cuando los citricos tienen, al menos, un año de edad en tratamiento de pre-emergencia de las malas hierbas.	La mayoría de las anuales.	Se puede repetir el tratamiento la primavera siguiente. Evitar el contacto con las hojas.
Vid	3 - 4	Aplicar a viñedos de tres años por lo menos, en primavera, en emergencia o poco después de la emergencia de las malas hierbas.	La mayoría de las anuales.	
Áreas sin cultivar de utilidad pública o privada: carreteras, conducciones petrolíferas, líneas férreas, aeropuertos, plantas industriales.	4,5 - 45	De 5,5 a 11 Kg/ha controlan la mayoría de las malas hierbas anuales. De 10 a 50 Kg/ha controla la mayoría de las anuales y las perennes.		



TABLA IV.- Sensibilidad de algunas especies de malas hierbas al CMU. (BR=efectos fitotóxicos, pero no letales incluso a dosis elevadas. PS, MS, S, TS: efectos letales a dosis muy elevadas, elevadas, normales o bajas). (Detroux y Gostinchar, 1967).

Especie vegetal	BR	PS	MS	S	TS
Anagallis arvensis				X	
Artemisia vulgaris		X			
Capsella bursa pastoris				X	
Chenopodium album				X	
Cirsium arvense			X		
Convulvulus arvensis		X			
Equisetum sp.		X			
Fumaria officinalis	X				
Lamium purpureum		X			
Matricaria inodora			X		
Plantago major					X
Polygonum persicaria				X	
Ranunculis acris	X				
Raphanus raphanistrum				X	
Sinapis alba			X		
Spergula arvensis					X
Stellaria media				X	
Taraxacum officinalis		X			
Tussilago farfara		X			
Urtica dioica		X			

1.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE CMU EN VEGETALES.

El análisis de los residuos de herbicidas en vegetales es un problema que ha atraído la atención de numerosos investigadores en los últimos años. A este respecto, es interesante consultar los volúmenes editados por Zweig (1964, 1967), Zweig y Sherma (1972), el manual de la CIPAC (1970), el de la US.FDA, HEW editado por Duggan (1969), los Métodos de la A.O.A.C. (1975) y la recopilación realizada por Hance y McKone (1976).

Los métodos utilizados se pueden clasificar en dos grandes grupos:

I - Químicos y físico-químicos.

II- Bioensayos,

que revisaremos brevemente a continuación.

1.4.1. Métodos químicos y físico-químicos.

1.4.1.1. Espectrofotométricos.

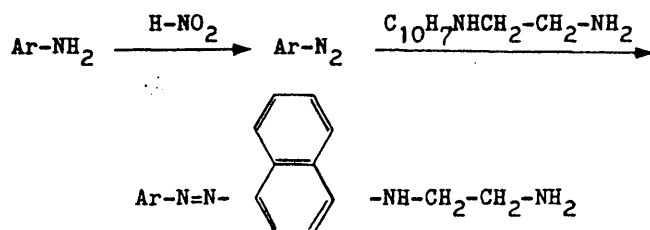
Los métodos espectrofotométricos se basan en la medida de la absorción de la luz o en la medida de la fluorescencia de un compuesto.

Los primeros, utilizan la región del espectro visible comprendida entre 400-800 nm (métodos colorimétricos), la región del ultravioleta comprendida entre 185-400 nm (absorciometría u.v.) o la región del infrarrojo comprendida entre 800 nm y 16 μ m (absorciometría de I.R.), y los segundos utilizan la región del visible o del u.v. (fluorimetría).

La fotolorimetría fue el primer método instrumental utilizado en el análisis de residuos de herbicidas

y, aunque todavía se utiliza en algunos casos, ha sido reemplazado por otros métodos más sensibles y específicos.

El método colorimétrico se basa en la hidrólisis del CMU hasta anilina que, posteriormente, es diazotada y acoplada convenientemente para obtener un diazoderivado coloreado. Como agente acoplante se utiliza la N-(1-naftil)etilenodiamina (Young y Gortner, 1953). La reacción general podría esquematizarse así:



Las anilinas se pueden producir por hidrólisis del substrato que contiene el residuo del herbicida o por extracción previa del mismo y posterior hidrólisis. En cualquier caso, deben destilarse en corriente de vapor y separarse los productos de la reacción por cromatografía en columna de celulosa (Dalton y Peace, 1962, Ercegovich y Witkonton, 1972).

También se puede formar una base de Schiff coloreada por reacción de la amina formada por la hidrólisis del CMU y el p-dimetilaminobenzaldehído (Fukel'man y Vol'man, 1968).

Mucho más sensible que el método colorimétrico es el de absorciometría en el u.v., como puede comprobarse por los trabajos de Davidson y col. (1968). Sin embargo, no se puede decir lo mismo de la absorciometría

I.R., pues su utilidad en la determinación de residuos de herbicidas viene limitada tanto por la dificultad de su extracción del material que lo contiene como por la sensibilidad del método (Blinn, 1971).

Entre los métodos fluorimétricos cabe destacar el de Frei y col. (1973), en el que separa por cromatografía en capa fina la anilina obtenida por hidrólisis del CMU y el derivado, densilado "in situ", lo valora por espectrofotometría de fluorescencia.

1.4.1.2. Cromatográficos.

1.4.1.2.1. Cromatografía gas-líquido.

En la última década, ha alcanzado un gran desarrollo la utilización de la cromatografía gaseosa en el estudio de la valoración cuantitativa de residuos de herbicidas. Los primeros investigadores que la utilizaron para este fin fueron Coulson y col. (1959) y Zweig y Archer (1960).

La importancia de esta técnica de valoración radica en su capacidad para separar pequeñas cantidades de herbicida, a menudo del orden de 1 ng o menores, de una serie de otros productos que se extraen al mismo tiempo de muestras tan complejas como suelos, tejidos vegetales o animales o agua.

Las características del detector y de la columna a emplear dependen de las propiedades físico-químicas del herbicida a estudiar. En el caso del CMU, los detectores de elección son los de ionización de llama, o el de captura electrónica, aunque ninguno de los dos es específico de este producto, por lo que es necesaria la utilización de un standard preparado con el herbicida puro.



En la práctica, los productos extraídos de las muestras junto con los residuos del herbicida pueden interferir y dificultar enormemente la valoración y, por tanto, disminuir considerablemente el límite de detección del herbicida o de sus metabolitos. Para superar esta dificultad, es necesaria una separación previa física o química del herbicida a partir del extracto original, antes de proceder a su análisis por cromatografía de gases, separación que suele consumir bastante tiempo y puede dar lugar a pérdida de algo de herbicida. A pesar de estas limitaciones, es el método más sensible y más ampliamente utilizado para el análisis de residuos de herbicidas.

Como ya hemos dicho, la extracción del residuo de herbicida del sustrato que lo contiene es el paso previo de una serie de manipulaciones que conducen a la valoración final del compuesto. La técnica de extracción depende del sustrato en que se encuentre y de las características físico-químicas del herbicida o de sus productos de degradación (Onley y Yip, 1969), posteriormente, el extracto debe ser purificado y, en algunos casos, es preciso formar un derivado del herbicida o de sus productos de degradación para su detección por cromatografía de gases. Para el CMU, la técnica más general ha sido la de formar derivados halogenados (Baunok y Geissbühler, 1968; Kossman, 1971). Una técnica interesante también es la utilizada por Cohen y Wheals (1969) para herbicidas derivados de la urea que consigte en hidrolizar los compuestos obtenidos por extracción clorofórmica hasta aminas y formación posterior de los 2-4 dinitrofenilderivados que los separan por cromatografía en capa fina y los valoran por cromatografía de gases, utilizando un detector de captura electrónica.



Otros autores (Young y Gortner, 1953; Dalton y Peace, 1962; Voss y Geissbühler, 1971) realizan la hidrólisis previa a la extracción con posterior aislamiento y valoración de la amina resultante.

1.4.1.2.2. Cromatografía en papel.

Es un método sencillo y económico pero lento, sin embargo, es útil para estudios cualitativos y para confirmación de la existencia de residuos que se pueden valorar posteriormente por otros métodos más sensibles (Fukel'man y Vol'man, 1968; Major, 1962 y Mitchell, 1966).

El método se puede utilizar también como semicuantitativo si se compara el área de la mancha correspondiente al herbicida con la de un standard, por utilización de un densitómetro o por pesada. El reactivo utilizado para visualizar el CMU o sus derivados es el p-dimetilaminobenzaldehído (Oswiecińska y Golcz, 1969). También se pueden utilizar métodos no destructivos o reversibles en los que las manchas son recortadas, extraídas con un solvente adecuado y el compuesto valorado por cualquier método analítico. En este caso, las manchas se pueden visualizar con vapores de iodo.

1.4.1.2.3. Cromatografía en capa fina.

Es una de las técnicas más utilizadas por su versatilidad y rapidez (Abott y col., 1967; Askew y col., 1968; El Dib, 1970; Look y White, 1970; Smith y Fitzpatrick, 1971).

Se pueden utilizar cromatoplacas con distintos soportes a los que se puede adicionar un indicador de fluorescencia, lo que permite visualizar las manchas a la luz u.v. También es posible la formación de derivados coloreados o no, ya sea por hidrólisis previa del

extracto original y formación del derivado una vez desarrollada la placa (Onley y Yip, 1969), o por cromatografía de las sustancias coloreadas formadas por reacción de los productos de hidrólisis y el reactivo correspondiente (Geissbühler y Gross, 1967). Otros autores (Guardigli y col., 1971) forman el derivado nitrado del CMU antes de realizar la cromatografía y reducen este compuesto a la amina correspondiente, una vez desarrollada la placa, las aminas correspondientes se pueden visualizar como antes dijimos con p-dimetilaminobenzaldehído (Yip y Howard, 1966). Si las manchas se visualizan por medios no destructivos (luz u.v., vapores de iodo), se pueden raspar, eluir y valorar por otros métodos analíticos (Ray y Wilcox, 1967).

1.4.1.2.4. Cromatografía líquido-líquido de alta presión.

Presenta las ventajas sobre la cromatografía de gases de que puede variarse la fase móvil y aumentar, por tanto, la posibilidad de una separación mejor. Kirkland (1969, 1971), fue capaz de separar por este procedimiento una serie de herbicidas derivados de la urea, muy difícil de conseguir por otros métodos. El inconveniente es que los detectores, tanto de u.v. como de fluorescencia, no son universales ni tan sensibles como los utilizados en cromatografía gaseosa.

1.4.1.3. Otras técnicas analíticas.

Existen otras técnicas de mucha menor difusión, por su elevado costo, pero de gran utilidad en la valoración e identificación, tanto de la molécula original de herbicida como de sus productos de degradación. Entre ellas cabe destacar la espectrometría de masas

(Biros, 1971) y la resonancia magnética nuclear (Keith y Alford, 1970).

1.4.2. Bioensayos.

Un bioensayo consiste en someter a un material biológico a la acción de un producto biológicamente activo y determinar su concentración según la magnitud de la respuesta.

Las ventajas que presentan los métodos biológicos radican en la posibilidad de elaborar un bioensayo para cada tipo de herbicida, dependiendo de su mecanismo de acción, en un tiempo generalmente inferior al empleado con un método analítico instrumental y con técnicas generalmente sencillas y no costosas (Hance y McKone, 1976). Otra ventaja importante es que proporcionan un método directo de determinación de la cantidad de herbicida biológicamente activo, información que, con frecuencia, es más útil que el conocimiento de la cantidad total de herbicida existente, que sería el valor encontrado por otros métodos, especialmente cuando se valoran residuos en el agua o en suelos.

Cuando el sustrato son tejidos vegetales, el problema se complica porque los productos co-extraídos pueden interferir en la valoración posterior.

Como bioensayo se pueden utilizar las respuestas biológicas en las que intervienen plantas completas, - partes de plantas, algas y, en ocasiones, hongos.

Para que el método sea útil desde el punto de vista cuantitativo, la respuesta debe ser reproducible y estar en relación con la concentración del herbicida. En general, la respuesta biológica obtenida con una muestra desconocida se compara con la respuesta obtenida



para un standard con el que se ha elaborado una curva de calibrado. Algunos autores realizan esta curva de calibrado por simple representación, en papel milimetrado, del porcentaje de respuesta biológica obtenido en función de la dosis de herbicida, con lo que se obtiene una sigmoide en la que la linealidad se alcanza sólo para dosis muy próximas.

Si se representa la respuesta en función del logaritmo de la dosis, la sigmoide se hace lineal para un margen más amplio de concentraciones, y esta transformación es la más utilizada. Otros autores (Blackman, 1952; Sampford, 1952) prefieren la utilización de las unidades probit. En todo caso y para que los resultados sean válidos, es preciso someterlos a un riguroso análisis estadístico.

1.4.2.1. Métodos que utilizan plantas completas.

Son los más empleados como bioensayo, pues se pueden utilizar condiciones muy similares a las obtenidas en campo. Uno de los primeros investigadores que usó esta técnica fue Crafts (1935) al comparar el crecimiento de plantas en suelos que contenían una concentración conocida de herbicida con las que elaboró una curva dosis-respuesta, con el crecimiento de otras plantas en suelos que contenían una concentración desconocida del mismo herbicida.

La elección del substrato vegetal en este tipo de bioensayos, vendrá determinada por la sensibilidad del mismo al herbicida que se quiere estudiar. Así, la Avena sativa se ha utilizado mucho para el estudio de la determinación de residuos de herbicidas derivados de la urea, sin que esto quiera decir que esta especie vegetal sea la más sensible. Un dato importante a consi-

derar en este tipo de bioensayos es el tamaño de la planta, como ya hemos indicado anteriormente. En el caso de los cereales, se suelen utilizar 20 ó 30 días después de haber sido plantados. Sin embargo, el tiempo óptimo debe elegirse de acuerdo a cada tipo de ensayo. En el caso de los herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, se debe esperar, como mínimo, el tiempo necesario para que se consuman las reservas de las semillas, porque sólo entonces son representativos los efectos del herbicida sobre el tamaño de la planta.

Como parámetros de evaluación de respuesta, se pueden utilizar el peso fresco o seco de las partes aéreas, el peso o longitud de las raíces, o la altura de la planta (Horowitz, 1970). Otros autores (Dowler, 1969) prefieren utilizar un sistema de evaluación basado en la observación visual de los síntomas fitotóxicos causados por el herbicida. Un método similar es el empleado por Santelman y col. (1971), en el que además de la observación visual de los efectos fitotóxicos producidos por el herbicida en la planta, tienen en cuenta la altura de la misma y su peso fresco y seco.

No hay que olvidar, en los bioensayos con plantas completas, la importancia de los factores ambientales que afectan tanto a la sensibilidad como a la reproducibilidad del método. Entre ellos cabe destacar: la temperatura, intensidad de iluminación, duración del día, humedad relativa y nutrientes. Este tipo de control tiene el inconveniente de que sólo se puede realizar en cámaras de crecimiento, lo que encarece de modo considerable el bioensayo.

1.4.2.2. Métodos que utilizan el crecimiento raíz/tallo.

El principal inconveniente en el uso convencional de plantas completas es el tiempo empleado para

obtener un resultado, por lo que algunos investigadores (Mazury y col, 1969) han buscado métodos más rápidos que consisten, fundamentalmente, en hacer germinar las semillas de las plantas a estudiar en un papel de filtro humedecido con solución de herbicida y medir la longitud del tallo y de las raíces después de un intervalo de tiempo determinado que, generalmente, son 96 horas. Existen diversas modificaciones a este método, entre las que la más utilizada es la de Parker (1964).

1.4.2.3. Métodos que utilizan algas.

Las algas parecen ser idóneas como organismo de bioensayo para la detección de residuos de herbicidas que actúan como inhibidores de la fotosíntesis. La Chlorella pyrenoidosa ha sido empleada por Gramlich y Frans (1964) para determinar residuos de ácido naftilacético, 2-4, D y atrazina. Atkins y Tchan (1967) describieron un método en el que se estimaba la inhibición del crecimiento de la Chlorella sp. en el líquido sobre nadante de un barro de suelo con una concentración conocida de atrazina. Con este mismo método, Addison y Bardsley (1968) encontraron que el organismo era sensible para 0,1 p.p.m. de diuron. Sin embargo, Cho y col. (1972) informaron que existe un mutante de la Chlorella que puede tolerar hasta 200 p.p.m. de CMU, lo que hace suponer que la presencia de tales mutantes resistentes en el inóculo inicial pudiera afectar significativamente a los resultados globales.

1.4.2.4. Métodos que utilizan otros organismos acuáticos.

Diversos autores (Parker, 1964, 1965) han utilizado la Lemna sp. o plantas similares como organismos

de bioensayo, relacionando el peso de la fronda, el área y el color con la concentración del herbicida, comprobando que tanto la intensidad como el tipo de luz y de agua utilizados, afectaban la respuesta biológica de este substrato.

1.4.2.5. Métodos que utilizan hongos.

El Aspergillus niger se ha empleado también como organismo de bioensayo para la determinación de residuos de herbicidas derivados de la urea (Murray y col., 1969), pero su sensibilidad es mucho menor que la de los organismos fotosintéticos.

1.4.3. Consideraciones sobre los métodos de análisis de residuos de herbicidas.

Después de dar esta visión general de los métodos utilizados en el análisis de residuos de herbicidas, es difícil emitir un juicio sobre cuál sería el método de elección para cada caso particular. En realidad, es poco corriente que se establezcan comparaciones entre los bioensayos entre sí o entre éstos y los métodos analíticos, aunque existen algunos autores que han proporcionado datos de enorme interés en este sentido. Así, Bailey (1970) encontró que el método de Parker (1964, 1965), que utiliza la Lemna, era más sensible que el método que utiliza la Avena para el monurón. Con una cepa de Chlorella de alta temperatura, Kratky y Warren (1971 a) encontraron resultados más sensibles en la determinación de residuos de atrazina que los obtenidos con soja y que ésta, a su vez, era similar a la cebada y al pepino y menos sensible que la remolacha. También compararon su método (Kratky y Warren, 1971 b) con el del crecimiento raíz/tallo de Parker (1964, 1965)

para la determinación de residuos de 42 herbicidas, comprobando que el método de la Chlorella era el más sensible para la valoración de residuos de herbicidas inhibidores de la fotosíntesis y que el que mide el crecimiento de la raíz/tallo lo era para la mayoría de los herbicidas, exceptuando estos últimos.

El límite de sensibilidad para obtener el 50% de inhibición es de 1 p.p.m. o menos para 31 herbicidas diferentes por cualquiera de los dos métodos.

Es difícil comparar los métodos biológicos con los instrumentales, ya que el proceso de extracción necesario en estos últimos, puede arrastrar herbicida que no es biológicamente activo, especialmente cuando se trabaja en condiciones de campo. Son de destacar los trabajos de Sikka y Davis (1966), que encontraron una buena correlación entre los resultados obtenidos con un bioensayo en Avena para herbicidas derivados de la urea y los obtenidos por espectrofotometría u.v., aunque el coeficiente de correlación de la línea de regresión obtenida no fue la unidad. También encontraron buena concordancia Fryer y Kirkland (1970), en la evaluación de residuos de simazina determinados por un bioensayo con Brassica rapa como substrato biológico y la valoración por cromatografía de gases, siendo, a veces, incluso más sensible el primero. A similares conclusiones llegan Santelman y col. (1971), encontrando que los métodos espectrofotométricos y cromatográficos para la determinación de residuos de prometrina, daban valores que estaban en concordancia con los obtenidos por un bioensayo con la cebada.

Como resumen y de acuerdo con la tendencia general, se puede afirmar que los bioensayos son los métodos más sensibles y que más se aproximan a la realidad biológica en la determinación de residuos de -

- 48 -

herbicidas, y que la cromatografía de gases o de líquidos de alta presión son los menos variables. En todo caso, la primera consideración que debe establecerse al elegir un método analítico, es precisar cuál es el grado de especificidad requerido para el análisis y sus límites de detección, contando con los métodos de que se dispone en el laboratorio donde va a efectuarse la investigación.



2. MATERIAL Y METODOS .

2.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS CULTIVADAS.

Se estudiaron los efectos fitotóxicos producidos por el CMU, absorbido radicularmente, en diferentes especies de plantas cultivadas en invernadero, en función de la concentración del herbicida y del tiempo de tratamiento, comparándolas con plantas testigo sin tratar - mantenidas en iguales condiciones ambientales.

2.1.1. Especies vegetales ensayadas.

Cebada (*Hordeum vulgare*) L.
Avena (*Avena sativa*) L.
Trigo (*Triticum aestivum*) L.
Maíz (*Zea mays*) L.
Judía (*Phaseolus vulgaris*) L.
Tomate (*Lycopersicon esculentum*) L.

2.1.2. Condiciones de cultivo.

Se pusieron a germinar las semillas de las especies indicadas en el apartado 2.1.1, en arena estéril humedecida con agua. Una vez germinadas, se regaron con solución nutritiva de Bidwell (1974), cuya composición se detalla en la tabla V.

Al cabo de dos semanas, en el caso de la cebada, avena y trigo, tres en el del maíz, cuatro para la judía y seis para el tomate, se pasaron las plántulas cuidadosamente a vasos de cultivo que contenían la misma solución nutritiva (Fig. 3), y se colocaron en una cámara de cultivo a una temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $65 \pm 5\%$. Durante la experiencia -

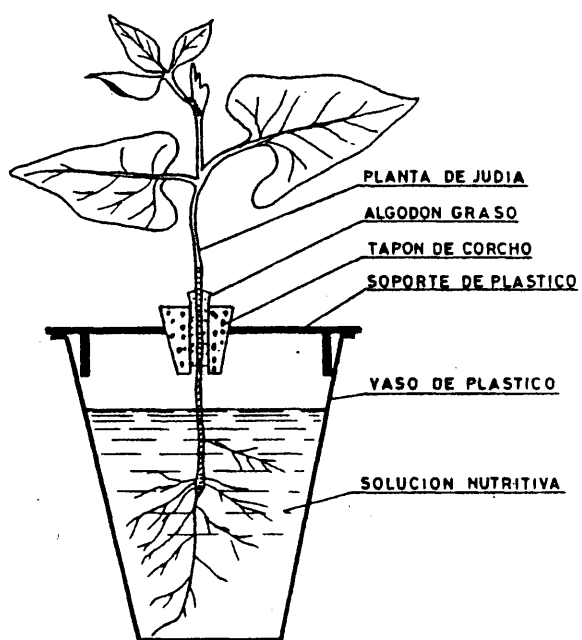
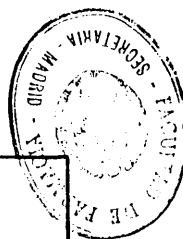


FIG.3
DISPOSICION DE LAS PLANTAS EN SOLUCION NUTRITIVA

TABLA V.- Composición de la solución nutritiva de Bidwell (1974).

COMPUESTO Macronutrientes	CONCENTRACION mmol/l	COMPUESTO Micronutrientes	CONCENTRACION mg/l
KNO_3	13,3	H_3BO_3	2,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	5,88	$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,5
KH_2PO_4	5,27	ZnCl_2	0,10
MgSO_4	2,67	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
FeCl_3	0,62	MoO_3	0,05



estuvieron sometidas a una iluminación continua de 14 W/m² suministrados por tubos Gro-lux (Sylvania) de 40 W.

Al cabo de tres días, tiempo que se consideró necesario para que las plantas estuvieran adaptadas a este ambiente, se comenzó la experiencia.

Se estudió el efecto fitotóxico de nueve concentraciones distintas de CMU* comprendidas entre 10⁻⁴ M y 10⁻¹² M sobre cada una de las especies vegetales arriba indicadas; frente a los testigos sin tratar.

Las soluciones problema se prepararon por dilución de una solución stock obtenida del siguiente modo: Se pesaron, exactamente, 198,7 mg de monurón, químicamente puro, se introdujeron en un matraz aforado de 1000 cc, se añadieron 2 cc de etanol para disolverlos completamente y se completó con solución nutritiva de Bidwell hasta el enrase. La concentración de esta solución stock es de 10⁻³ M.

Las plantas se dividieron en dos grupos de 40 plantas cada uno. El tratamiento se efectuó durante - cuatro semanas, cambiándose las soluciones respectivas tres veces por semana.

Las plantas del primer grupo se colocaron en las distintas soluciones de CMU a razón de cuatro plantas por cada concentración de herbicida. A las cuatro plantas testigo sólo se añadió solución nutritiva.

Las del segundo grupo, se dividieron de modo análogo y se colocaron en iguales condiciones que las expresadas para el primer grupo durante la primera semana de la experiencia. Al cabo de este tiempo, se pasaron a solución nutritiva de Bidwell durante las

* Pm.CMU = 198,7

tres semanas restantes con el fin de estudiar la recuperación de las plantas al eliminar el compuesto tóxico.

2.1.3. Observaciones realizadas.

Con objeto de estudiar el efecto fitotóxico del CMU sobre el desarrollo de las plantas a nivel macroscópico, se realizaron observaciones periódicas durante 1 mes.

Como índice de desarrollo se eligió el número total de hojas (o de folíolos en el caso de la judía), ya que este parámetro era de fácil e inequívoca determinación.

Se prefirió este índice al de longitud del tallo por la dificultad que representa el tener esta medida en las plántulas de cereales.

A la vez que se determinaba el número de folíolos o de hojas, se observaba la existencia o no de síntomas de marchitamiento y de expresión clara de letalidad.

2.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LAS HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS.

Se estudió el efecto del CMU a concentraciones variables entre 10^{-4} M y 10^{-8} M, después de 1 y 7 días de absorción radicular, sobre la actividad fotosintética (A.F.) de las hojas de las plantas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate, cultivadas según se citó en el punto 2.1.2.

La aplicación del CMU se realizó en plantas de cebada, trigo y avena a las 2 semanas; en maíz a las 3 semanas, en judía a las 4 semanas y en tomate a las 6 semanas de desarrollo.

Para determinar la A.F. se utilizó $^{14}\text{CO}_2$ aplicado según el método descrito por Fernández (1975, 1978).

2.2.1. Estimación de la concentración de CMU en las hojas.

Una vez germinadas las plántulas y alcanzado el tamaño indicado en 2.1.2, se pasaron a vasos de cultivo con solución nutritiva durante tres días.

Para estudiar la concentración que alcanzaba el CMU en las plantas que lo habían absorbido radicalmente, se utilizó CMU marcado con ^{14}C (monurón-2- ^{14}C) de 3,88 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ de actividad específica ($1,42 \times 10^5$ bq/ μmol), comprobada por la medida de la D.O. a 246 nm ($K = 10,593 \mu\text{g}/\text{cc}$) y por conteaje en centelleo líquido.

Las soluciones de CMU- ^{14}C se prepararon a partir de una solución stock. En la tabla VI se expresan los valores de la concentración radiactiva de las diferentes soluciones de CMU- ^{14}C utilizadas.

Se emplearon 14 plantas por experiencia, colocando dos plantas en cada uno de los vasos de cultivo

TABLA VI.- Concentración radiactiva de las diferentes soluciones de CMU- ^{14}C .
(Ag: 3'88 mCi/mmol)

Concentración molar (mmol/cc)	Concentración radiactiva (dpm/cc)
1×10^{-4}	$8,61 \times 10^5$
1×10^{-5}	$8,61 \times 10^4$
1×10^{-6}	$8,61 \times 10^3$
1×10^{-7}	$8,61 \times 10^2$
1×10^{-8}	$8,61 \times 10$
0	-

que contenían las diferentes concentraciones de CMU-¹⁴C y las cuatro restantes en 2 vasos que contenían solución nutritiva.

Durante la semana que duró la experiencia se man tuvieron en cámara de cultivo en las condiciones de T_a, humedad relativa e iluminación indicadas en 2.1.2.

La estimación de la concentración alcanzada por el CMU en las hojas de las distintas plantas se realizó teniendo en cuenta la cantidad de CMU detectada por con taje en centelleo líquido (c.l.) de una muestra de hoja y la humedad de la misma. Para ello, se tomó una mues tra de hoja de un peso fresco comprendido entre 50 y 100 mg (determinado exactamente), se introdujo en un vial de con taje en c.l., se desecó en estufa a 60°C du rante 24 horas, hasta peso constante. A la muestra de- secada se añadió 1 cc de NO₃H al 35% y se dig irió en baño ma ría a 90°C durante 5 horas. Una vez frío se aña dieron 15 cc de Instagel, se agitó vigorosamente hasta la disolución completa del material vegetal y se proce dió a contar en centelleo líquido (Fernández, 1975, 1978).

Para conocer el porcentaje de la actividad que correspondía al CMU dentro de la actividad total detec tada en cada muestra, paralelamente se tomó otra mues tra de hoja que se mac eró con etanol y el extracto, una vez concentrado, se cro matografió en capa fina en pla- cas de gel de sílice Merck, sin indicador de fluore- cencia, de 0,25 mm de espesor, lavadas con metanol y activadas en estufa a 60°C durante 1 hora, utilizando cloroformo:nitrometano (1:1) como eluyente.

Para detectar el CMU-¹⁴C sin degradar, así como sus productos de transformación, se realizó una autorra diografía con películas de Rayos X Kodak R-B-54, y se procedió al raspado y con taje de las diferentes manchas radiactivas detectadas.

Multiplicando la actividad total detectada en la muestra por el % correspondiente a la actividad del CMU obtenida en el análisis radiocromatográfico, se obtuvo la actividad correspondiente al CMU de la muestra, y dividiendo ésta por la A_S del CMU- ^{14}C , y por el contenido acuoso de la muestra, se obtiene la concentración que se estima alcanza el CMU en la hoja.

2.2.2. Asimilación del $^{14}CO_2$.

Para medir la actividad fotosintética de las hojas de las distintas especies a estudiar, se utilizó el método descrito por Fernández (1975, 1978).

El procedimiento consiste en hacer pasar, durante 30 segundos, una corriente de aire con $^{14}CO_2$ (300 p.p.m., A_S : 4 $\mu Ci/\mu mol$), a través de una microcámara transparente, en cuyo interior se encuentra la parte de la hoja en que se va a determinar la actividad fotosintética.

El $^{14}CO_2$ se genera a partir de $^{14}CO_3Ba$ de una actividad específica conocida (en nuestro caso 4 $\mu Ci/\mu mol$) y se calcula la cantidad necesaria para producir la concentración de CO_2 deseada en el volumen total de aire que se vaya a utilizar.

Para las condiciones de nuestro laboratorio (710 mm de presión atmosférica y 20°C de temperatura), se utilizan 2,31 mg de $^{14}CO_3Ba$ para producir 1 litro de aire con 300 p.p.m. de $^{14}CO_2$.

La cantidad deseada de $^{14}CO_3Ba$ se deposita en un vial que se cierra herméticamente.

Se produce el vacío previo y se inyectan 5 cc de ácido láctico 2 N.



El $^{14}\text{CO}_2$ desprendido está en equilibrio entre el líquido y la atmósfera del interior del vial.

Por medio de una jeringa provista de una llave de 2 vías se hace pasar aire a través de una columna de cal sodada (para retener el CO_2) y por el vial que contiene el $^{14}\text{CO}_2$, para arrastrarlo y llenar un balón de polietileno provisto de una boca con obturador (Fig. 4).

Con objeto de controlar la concentración radiactiva de la mezcla de aire producido y su posible variación en el tiempo, se toma una muestra a tiempo cero, otra a mitad y otra al final de la experiencia, que se recogen sobre etanolamina y se valoran por centelleo líquido.

La concentración radiactiva del aire del balón (expresada en dpm/cc) se determina directamente dividiendo las cpm obtenidas por la eficiencia del conteo.

La microcámara propiamente dicha, representada en la Fig. 5, tiene una superficie de 4 cm^2 y una profundidad de 5 cm.

El aire marcado, al entrar en la cámara, se distribuye homogéneamente y sale por un tubo que contiene cal sodada para absorber el $^{14}\text{CO}_2$.

El gas se hace pasar únicamente por el envés de la hoja.

La parte superior de la cámara es transparente para dejar pasar la luz hasta la hoja.

Con objeto de delimitar la zona de hoja que abarca la microcámara, en los bordes de ésta, existen unos pivotes de acero inoxidable que dejan una marca en la hoja al presionar las pinzas sobre ambas placas.

Durante la experiencia, la cámara se ilumina con 60.000 luxes por medio de un foco de 500 W (Osram--

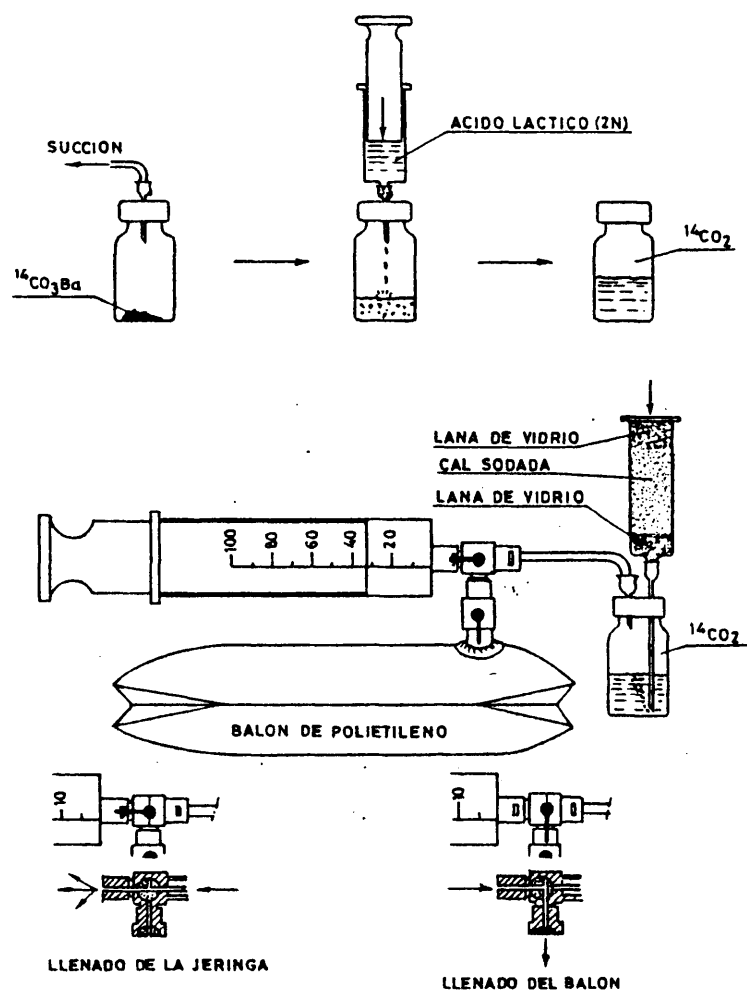


FIG. 4
PREPARACION DEL AIRE MARCADO CON $^{14}\text{CO}_2$

- 61 -

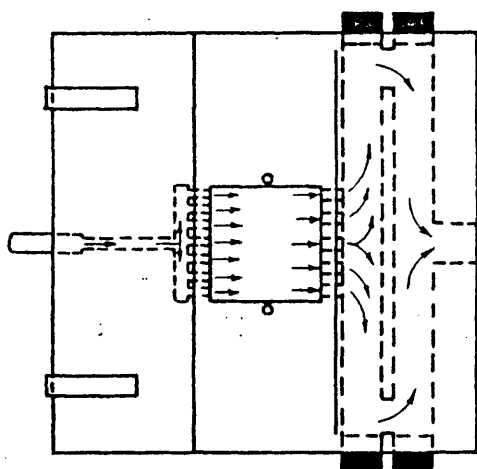
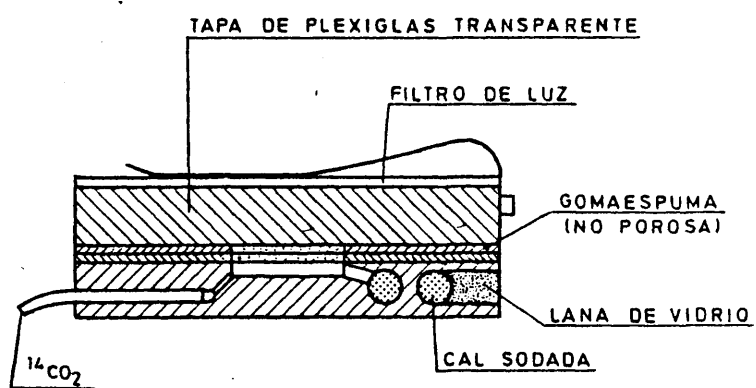


FIG. 5
ESQUEMA DE LA MICROCAMARA UTILIZADA PARA LA
MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA EN HOJAS
DE DIVERSAS PLANTAS CULTIVADAS.

Nitraphot). Después de 30 segundos, se corta la iluminación y la porción de hoja sometida a experimentación se deseca a 90°C durante 24 horas. Acto seguido se procesa la muestra para contaje en c.l. por medio de una digestión con NO_3H al 35%, según se indicó en el punto 2.2.1.

A partir de las cpm obtenidas en cada vial de centelleo líquido, se puede determinar la actividad fotosintética de las diferentes hojas expresada en micromoles de CO_2 asimilado por cm^2 de hoja y por hora, aplicando la fórmula:

$$A_f = \frac{\text{cpm} \cdot 3600}{e \cdot A_s \cdot S \cdot t}$$

en la que:

A_f = actividad fotosintética.

cpm = cuentas por minuto.

e = eficiencia del contaje.

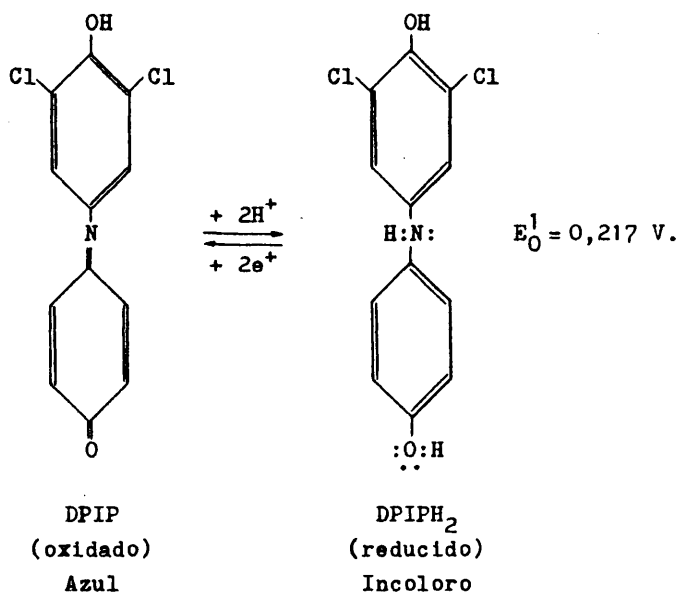
A_s = actividad específica del $^{14}\text{CO}_2$ expresado en desintegración por minuto (dpm) por micromol de CO_2 .

S = superficie de la hoja expuesta expresada en cm^2 .

t = tiempo de exposición de la hoja al flujo de aire marcado, expresado en segundos.

2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA REACCION DE HILL EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS.

Se utilizó el 2-6 diclorofenol indofenol (DPIP) como indicador de óxido-reducción por la doble ventaja de poseer un potencial de óxido-reducción de + 0,217 V (Y. Kouchkousky, 1963), lo que le hace susceptible de reducirse o por el citocromo b de potencial $E_0^2 = + 0,05$ V, o por la plastoquinona reducida de potencial $E_0^1 = 0$ V, y por permitir valorar la reacción de Hill colorimétricamente, ya que el DPIP oxidado es azul y al reducirse se decolora.



El CMU inhibe la reacción de Hill, y por tanto, inhibirá la reducción del DPIP en presencia de cloroplastos iluminados.

Basándose en este principio, se intentó determinar la relación existente entre la concentración de CMU y el grado de inhibición de la reacción de Hill, en fragmentos de cloroplastos aislados de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate.

2.3.1. Aislamiento de cloroplastos.

Se siguió el método de Whatley y Arnon (1963).

Se partió de 50 g de hojas frescas, mantenidas a baja temperatura (0-5°C), de las que se suprimieron las nerviaciones principales.

Se añadieron 100 cc de ClNa al 2%, solución que es hipotónica con respecto a la célula que se quiera romper, pero isotónica con respecto a los cloroplastos.

Se trituró en batidora, se filtró a través de gasa doble y se recogió el filtrado en baño de hielo.

El filtrado se centrifugó a 300 g durante 2 minutos para eliminar los restos de paredes y núcleos.

En el sobrenadante quedaron los cloroplastos junto con mitocondrias, ribosomas, enzimas solubles, etc.

Este sobrenadante se volvió a centrifugar durante 7 minutos a 1000 g para sedimentar los fragmentos de cloroplastos. El sedimento se resuspendió en ClNa 2% con ayuda de un algodón hidrófilo sujeto al extremo de una varilla.

Se repitió la centrifugación durante 10 minutos a 1000 g. Completada ésta, se consideró que los cloroplastos estaban suficientemente lavados.

Se tiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en una solución de ClNa al 0,2% hipotónica con respecto a los cloroplastos, por lo que se rompen liberando los granos.

El volumen de ClNa al 0,2% añadido, se calculó teniendo en cuenta el % de clorofila deseado y el volumen necesario para la experiencia.

Los cloroplastos aislados se conservaron en baño de hielo en un recipiente forrado con papel de aluminio para preservarlos de la luz.

El proceso seguido para el aislamiento de cloroplastos se representa en la Fig. 6.

No se utilizó la solución tampón tris 0,2 M en el aislamiento de cloroplastos (como indican Arnon y col., 1954), ni la solución de fosfatos 0,1 M en las cubetas de medida, por haberse determinado previamente - que no influían en la reducción del DPIP por los cloroplastos.

Antes de comenzar a trabajar con los cloroplastos recién aislados se calculó el contenido en clorofila de la suspensión.

2.3.2. Determinación del contenido en clorofila.

La determinación del contenido en clorofilas se realizó en la solución de cloroplastos y en hojas de plantas frescas.

De esta forma, se puede relacionar la actividad fotosintética de los cloroplastos, determinada por la reacción de Hill con la superficie foliar que ocuparían "in vivo" y, por tanto, comparar los resultados obtenidos por este método con los obtenidos para la asimilación del $^{14}\text{CO}_2$.

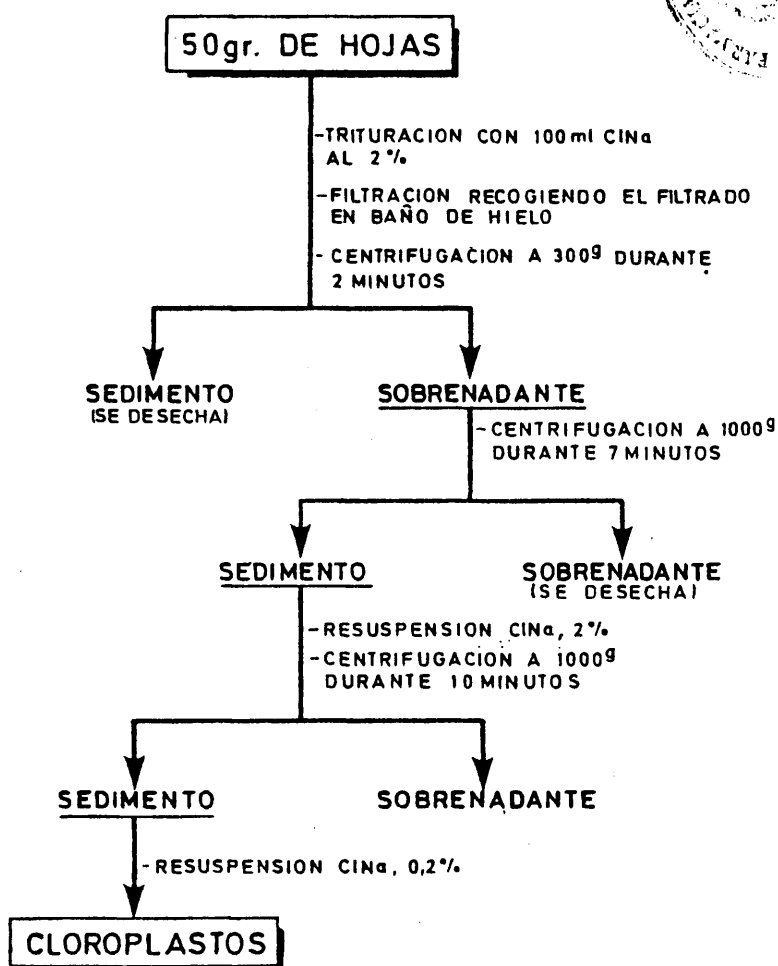


FIG. 6
ESQUEMA DEL PROCESO DE AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE
CLOROPLASTOS EN HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS

2.3.2.1. Area foliar específica.

El área foliar específica de las hojas frescas, se determinó de la siguiente manera: En un pliego de papel milimetrado se dibujó el contorno de una hoja cuyo peso se determinó previamente, y se recortó.

También se recortó un cuadrado de papel de superficie conocida (5 x 5 cm). Se pesaron los dos recortes, se calculó la superficie de la hoja y, como consecuencia, se obtuvo la relación superficie/peso fresco (área foliar específica).

2.3.2.2. Análisis de clorofilas.

La estimación del contenido en clorofila por unidad de superficie de hoja se realizó de la siguiente manera:

Se pesaron 0,1 g de hojas frescas y se maceraron con 5 cc de acetona al 80% y 0,025 g de CO_3Mg ; se filtró el macerado a través de papel Whatman N° 1 y se lavó el papel de filtro con acetona al 80% hasta obtener un volumen final de 25 ml, realizándose todo el proceso en un baño de hielo.

La densidad óptica de las muestras se determinó en un colorímetro a 645, 652 y 663 nm frente a un blanco de acetona al 80%.

El contenido en clorofila, expresado en mg/litro, se calculó aplicando la ecuación de Arnon (1949):

$$\text{Cl total (mg/l)} = 8,02 \text{ DO}_{663} + 20,20 \text{ DO}_{645}$$

La cantidad de clorofila por unidad de superficie foliar se deduce a partir del peso de la hoja, volumen de solución, concentración de clorofila y la -

relación peso/superficie determinada previamente.

2.3.2.3. En la suspensión de cloroplastos.

Se toman 0,1 cc de la suspensión salina de cloroplastos, recién preparada, y se diluyen con 20 cc de acetona al 80%. La suspensión, después de agitada, se filtra a través de papel Whatman Nº 1.

El filtrado se recoge en una cubeta de espectrofotómetro y se determina su densidad óptica a 652 nm frente a un blanco de acetona al 80%.

El contenido en clorofila, expresado en mg/cc de la suspensión original, viene dado al multiplicar la densidad óptica medida por el factor 5,8 (Whatley y Arnon, 1963).

La concentración final de clorofila se ajustó a 0,319 mg/cc para el trabajo experimental.

2.3.3. Condiciones de la reacción.

Se estudió el efecto de cinco concentraciones de CMU, comprendidas entre $1,46 \times 10^{-4}$ M y $1,46 \times 10^{-8}$ M sobre los fragmentos de cloroplastos aislados de hojas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate.

A cada cubeta, según el tratamiento, se le añadieron los componentes que se detallan en la tabla VII.

Una vez preparadas las cubetas y medida la densidad óptica inicial, se colocaron en un baño transparente termostatzado a 25°C y se introdujo una aguja hasta el fondo de cada tubo, por la que se hizo borbotear nitrógeno con el doble fin de agitar la suspensión y mantener una atmósfera inerte.

TABLA VII.- Componentes añadidos a cada cubeta según tratamiento.

Susp. cloroplastos (cc)	Agua (cc)	DPIP (μ M)	Conc. CMU en la solución madre (M)	Sol. CMU (cc)	Vol. final (cc)	Conc. CMU en el volumen final (M)
0,5	4	0	0	0	4,5	0
0,5	2	0,25	$3,75 \times 10^{-8}$	1,75	4,5	$1,46 \times 10^{-8}$
0,5	2	0,25	$3,75 \times 10^{-7}$	1,75	4,5	$1,46 \times 10^{-7}$
0,5	2	0,25	$3,75 \times 10^{-6}$	1,75	4,5	$1,46 \times 10^{-6}$
0,5	2	0,25	$3,75 \times 10^{-5}$	1,75	4,5	$1,46 \times 10^{-5}$
0,5	2	0,25	$3,75 \times 10^{-4}$	1,75	4,5	$1,46 \times 10^{-4}$

El baño se iluminó lateralmente, por ambos costados, mediante dos paneles de tres focos (Osram-Nitra phot R) de 500 W cada uno que permitieron, en conjunto, tener una iluminación de 75.000 luxes.

El baño está provisto de doble pared por la que circula agua para evitar la transmisión del calor por parte de los focos a las cubetas. El conjunto del baño, disposición de las cubetas y sistema de iluminación se representa en la Fig. 7.

Después de un período de iluminación variable, se midió la densidad óptica del contenido de las cubetas a 540 nm.

Para el estudio de la cinética de reducción del DPIP se iluminó durante 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 ó 5 minutos, mientras que, para las distintas experiencias, siempre se realizaron las lecturas después de un minuto de iluminación.

Con objeto de comprobar la reducción del DPIP independientemente de la fotosíntesis, se repitió el testigo forrando las cubetas con papel de aluminio, y también se repitió con cloroplastos hervidos.

Para cada tratamiento se hicieron sólo cinco repeticiones por la necesidad de efectuar las lecturas de la densidad óptica en el menor tiempo posible después del período de iluminación.

Para evitar errores, las cubetas correspondientes a un mismo tratamiento no se leyeron consecutivamente, y durante el tiempo que duró la lectura, las restantes cubetas se mantuvieron en la oscuridad.

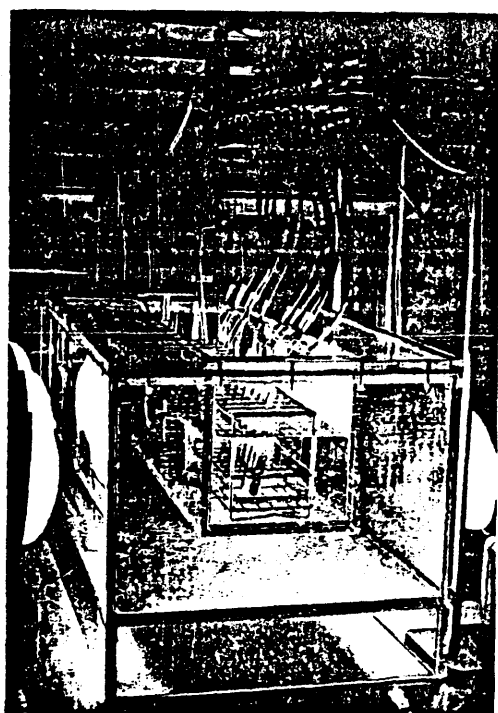
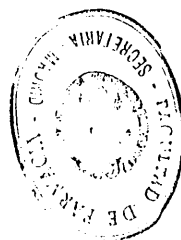


FIG.7
CONJUNTO DE BAÑO Y SISTEMA DE ILUMINACION PARA EL
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA EN CLOROPLASTOS
AISLADOS



2.3.4. Obtención de los resultados.

Con objeto de calcular la correspondencia entre la densidad óptica leída y el DPIP reducido, se hizo una curva de calibrado para cada planta, con la misma concentración de clorofila, variando la concentración del DPIP oxidado desde el valor inicial de 0,25 micromoles en 4,5 cc hasta cero.

Con los datos experimentales obtenidos, se ajustó la ecuación de la recta, trazando la línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados, para comprobar si estadísticamente todos los valores hallados satisfacían a la ley de Beer Lambert para las concentraciones consideradas.

Se comprobó que el coeficiente de correlación era muy próximo a la unidad y que se cumplía la citada ley, por lo que:

$$D.O. = K \times C$$

siendo:

D.O. = Densidad óptica leída a 540 nm frente a un patrón de DPIP totalmente reducido y análogo contenido en clorofila.

K = Pendiente de la recta.

C = Concentración de DPIP oxidado en la muestra.

La cantidad de DPIP oxidado en las cubetas viene expresada por la relación:

$$\text{DPIP oxidado} = \frac{DO}{K}$$

y la cantidad de DPIP que se ha reducido, en cada caso, se obtiene sustituyendo el incremento de DO en la expresión:

$$\text{DPIP reducido} = \frac{\Delta \text{DO}}{K}$$

La experiencia se repitió cinco veces para cada concentración y cada planta.

Por cada mol de DPIP reducido, en la reacción de Hill, se desprenden 0,5 moles de oxígeno. De este modo, se pueden determinar los micromoles de oxígeno desprendidos en cada tubo de reacción durante el minuto que dura la eliminación.

Al conocer la correspondencia entre los 0,5 cc de la suspensión de cloroplastos incorporados a la reacción y los cm² de hoja fresca a que corresponden, los resultados se pueden expresar como micromoles de oxígeno desprendido por hora y por cm² de hoja fresca.



2.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CMU SOBRE LA FOTOSINTESIS DEL ALGA CHLORELLA PYRENOIDOSA.

Se estudió el efecto inhibitor de nueve concentraciones diferentes de CMU, comprendidas entre 10^{-4} M y 10^{-12} M, sobre la fotosíntesis del alga Chl. pyrenoidosa.

2.4.1. Características del cultivo de Chl. pyrenoidosa.

Chlorella es un alga unicelular, clorofícea, inmóvil, de tamaño comprendido entre 40μ y 10μ , que, en condiciones favorables, crece rápidamente y se reproduce por división asexual en 2, 4, 8 ó 16 autoesporas, - proceso que puede controlarse tanto por condiciones internas como externas (Lorenzen, 1956, 1957; Kuhl y Lorenzen, 1964).

La división puede producirse en la oscuridad, - siempre que la Chlorella haya incrementado su masa celular en la luz.

Los parámetros fundamentales a considerar para un cultivo correcto de este alga son:

- a - Medio líquido con una composición y concentración adecuadas de nutrientes minerales.
- b - Cantidad suficiente de anhídrido carbónico.
- c - Energía luminosa suficiente en la zona del espectro visible para asegurar el crecimiento autótrofo del cultivo.
- d - Temperatura adecuada.
- e - Agitación continua para asegurar la exposición en la luz de todas las células de cultivo y evitar, de este modo, su sedimentación.

En un cultivo con iluminación constante, la cinética de crecimiento obedecería a una sigmoidea con una primera fase de crecimiento exponencial, una segunda de crecimiento lineal y una tercera, asintótica, en la que el crecimiento del número de células con respecto al tiempo, tiende a cero.

Las características, tanto fisiológicas como bioquímicas de las Chlorellas, varían enormemente durante las diferentes fases de crecimiento, por lo que resulta de extrema importancia controlar todas las condiciones para conseguir resultados experimentales reproducibles en el laboratorio.

2.4.2. Método de cultivo utilizado.

Se partió de un cultivo de Chl. pyrenoidosa proporcionado por el Dr. Rodríguez López (Instituto Marañón C.S.I.C.) que se conservó en tubos de agar inclinado, con un medio nutritivo cuya composición ha sido elaborada por el mismo Dr. Rodríguez López.

La preparación del medio de cultivo se realiza a partir de una solución stock de macronutrientes y micronutrientes, cuya composición se detalla en la tabla VIII.

Las soluciones stock, preparadas independientemente, se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 30'.

El medio de cultivo se preparaba inmediatamente antes de su utilización, mezclando, asépticamente, en cámara de flujo laminar los volúmenes necesarios de las respectivas soluciones stock en las siguientes proporciones:

TABLA VIII.- Composición de las soluciones stock del Dr. Rodríguez López para el cultivo del alga Chlorella.

MACRONUTRIENTES	Soluciones stock	Composición	Concentración
	A	NO_3K $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,111 g/l 8,111 g/l 0,690 g/l
	B	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,65 g/l
	C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,47 g/l
	D	EDTA $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KOH 1 N	26 g/l 25,3 g/l 2,31 g/l
MICRONUTRIENTES	E	$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	170 mg/l 290 mg/l 2,5 mg/l
	F	$\text{H} \cdot \text{BO}_3$ $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	610 mg/l 125 mg/l

Sol. A	100 cc
Sol. B	10 cc
Sol. C	10 cc
Sol. D	1 cc
Sol. F	1 cc
H ₂ O	destilada, c.s.p.	1000 cc



pH del medio: 7,5 .

Para preparar la sol. D, se añadieron 0,385 g de sulfato ferroso anhidro y 0,93 g de EDTA Merck a 80 cc de agua destilada. Se calentó a ebullición hasta disolución completa. Una vez frío, se completó con agua destilada hasta 100 cc. 1 cc de esta solución contiene la cantidad indicada de Fe disuelto.

Para los cultivos stock en agar inclinado, se utilizó el mismo medio nutritivo al que se añadió el 1% de agar para solidificarlo, el 1% de glucosa y el 0,1% de peptona, con el fin de observar posibles contaminaciones bacterianas. Los tubos se conservaron a 20°C sometidos a un ciclo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, siendo la luz artificial suministrada por tubos Gro-lux de Sylvania, efectuándose la resiembra cada ocho semanas.

A partir de los cultivos sólidos, se prepararon precultivos líquidos en matraces Erlenmeyer de 250 cc, convenientemente aireados, que contenían 200 cc de solución nutritiva. Los precultivos líquidos se mantuvieron a 25°C y se sometieron al mismo ciclo de luz-oscuridad de 14/10 horas para conseguir que la división celular quedara restringida a un corto período de tiempo, con lo que se sincroniza el cultivo y se consigue que, en cada momento sea lo más homogéneo posible, estimándose que, al principio de la fase luminosa, por lo -

menos el 98% de las células contadas en la primera hora de la fase oscura participan en el proceso de división y se encuentran en la misma fase de su ciclo vital (Kuhl y Lorenzen, 1964).

Al cabo de 48 horas, los cultivos han crecido lo suficiente como para poder ser distribuidos homogénea y asépticamente a cada uno de los tubos de una batería en los que se continúa el cultivo. La característica y disposición de los tubos de cultivo se pueden apreciar en la Fig. 8.

El inóculo inicial consistía en 10 cc del precultivo que se añadían asepticamente a los tubos de cultivo que contenían 400 cc de medio estéril. Periódicamente, se extraían 350 cc del cultivo y se reemplazaban por medio estéril con objeto de mantener a las células en la fase exponencial de crecimiento.

El control del crecimiento del cultivo se efectuaba diariamente por recuento del número de células/cc y densitometría a 475 nm. Siendo el nº standard de células en la última hora de la fase oscura de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ /cc y su D.O.: 0,075.

Los tubos de cultivo eran renovados y resembrados a partir de un precultivo nuevo cada cuatro semanas.

2.4.3. Normalización del contenido clorofílico de los cultivos para las determinaciones fotosintéticas.

Con objeto de que todas las experiencias de fotosíntesis se realizaran en cultivos con el mismo contenido en clorofila, se medía la concentración de ésta en el cultivo y se ajustaba por dilución con medio estéril, hasta que el contenido fuera de 20 mg/l.

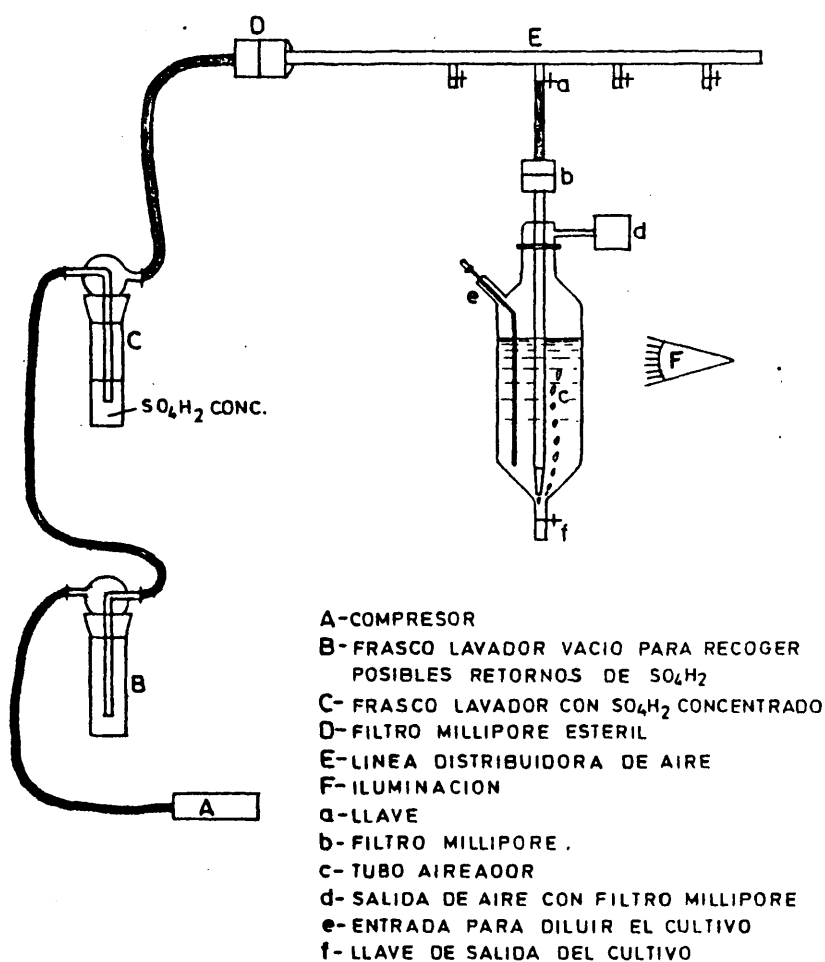


FIG. 8
 DISPOSITIVO PARA EL CULTIVO SINCRONO DE CHLORELLA
 PYRENOIDOSA

La determinación del contenido en clorofila en el cultivo inicial se realizaba de la siguiente manera:

Se toman 2 cc de la suspensión original de Chlorellas y se centrifugan durante 15' a 3000 r.p.m. El precipitado se resuspende en 3 cc de metanol hirviendo. Se centrifuga de nuevo durante 5' a 3000 r.p.m. y el sobrenadante se pasa a un matraz aforado de 10 cc de capacidad. El precipitado se resuspende en otros 5 cc de metanol hirviendo y se centrifuga de nuevo durante otros cinco minutos. El sobrenadante se añade al anterior y se enrasa hasta 10 cc con metanol.

Se mide la densidad óptica en un fotocolorímetro a 650 nm y 665 nm respectivamente, utilizando metanol como blanco.

La concentración en clorofila total se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$Cl\ total = 40 \times D.O.665 + 25,5 \times D.O.650$$

2.4.4. Utilización del electrodo de oxígeno en la determinación de la actividad fotosintética de una suspensión de Chlorella pyrenoidosa.

La actividad fotosintética del alga Chlorella pyrenoidosa y el efecto inhibitor de diferentes concentraciones de CMU sobre la misma, se determinó con un electrodo de oxígeno tipo Clarke.

2.4.4.1. Fundamento del electrodo de oxígeno.

El método polarográfico de determinación de la concentración de oxígeno en una solución se basa en medir la corriente que pasa a través de un sistema de



electrodos inmersos en una solución en función del voltaje aplicado, dependiendo esta magnitud de la concentración de los solutos. Una descripción del fundamento del método polarográfico es la realizada por Arditti y Dunn (1969).

El electrodo utilizado en nuestro estudio fue el YSI Modelo 53, tipo Clarke, que consiste en un cátodo de Pt y un ánodo de Ag inmersos en una solución saturada de ClK para el que magnitudes comprendidas entre 0,5 V y 0,8 V son proporcionales al contenido de oxígeno en la solución.

Al aplicar al electrodo de Pt un voltaje polarizante de -0,6 V, el electrodo de Ag reacciona con los iones Cl^- para formar ClAg, liberándose electrones en el proceso.

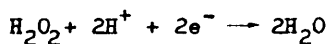
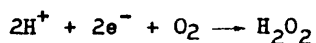
Estos electrones pueden utilizarse por el electrodo de Pt para reducir al O_2 . El proceso genera una corriente que es función lineal de la presión de O_2 en la solución que baña los electrodos. Un circuito eléctrico (Fig. 9) amplifica esta corriente para que pueda leerse o registrarse.

Las reacciones que tienen lugar en los electrodos son las siguientes:

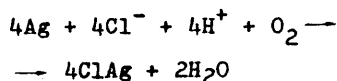
Electrodo de Ag:

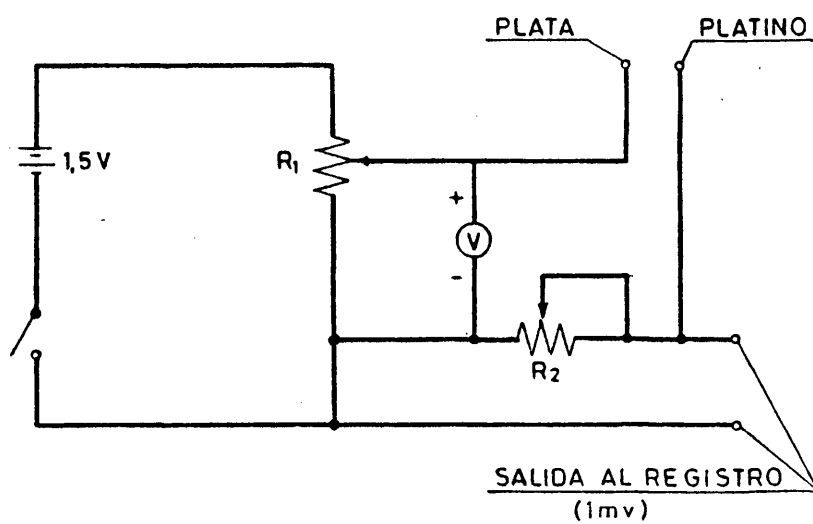


Electrodo de Pt:



En total:





R_1 = RESISTENCIA
 R_2 = RESISTENCIA
V = VOLTIMETRO

FIG.9
CIRCUITO ELECTRICO DEL ELECTRODO DE OXIGENO
(ARDITTI Y DUNN 1969)

El voltaje de polarización utilizado es de $-0,6\text{ V}$ a $-0,75\text{ V}$ y se mantiene por un reostato variable.

El electrodo (Fig. 10) está cubierto por una delgada membrana de teflón de $0,25\text{ mm}$ de espesor, permeable a los gases, que lo aísla eléctrica y químicamente de la solución. El oxígeno que difunde a través de la membrana despolariza el cátodo y permite que circule la corriente. Este oxígeno se consume rápidamente, permaneciendo la presión del mismo dentro de la membrana - prácticamente a cero, por lo que la difusión de este gas a través de la membrana es proporcional a la presión diferencial a ambos lados de la misma y la relación existente entre la corriente y la cantidad de oxígeno es estequiométrica, estableciéndose una relación lineal entre la presión externa de oxígeno y la corriente del electrodo que es, a su vez, proporcional a la cantidad de oxígeno que alcanza el electrodo y tiene la misma - tensión de oxígeno que el líquido del que procede.

2.4.4.2. Descripción del Equipo.

El equipo (Fig. 11), consta de un amplificador electrónico que proporciona el voltaje de polarización constante para los cuatro electrodos de oxígeno que pueden seleccionarse independientemente, y puede operar para una escala completa de oxígeno a 760 mm de Hg y para una escala completa de aire a la presión atmosférica.

A T° constante, comprendida entre 20°C y 40°C , el tiempo de respuesta del electrodo es de unos 10 segundos para el 90% de la escala total.

Los electrodos se introducen en unas cubetas de reacción provistas de un agitador magnético situado en el fondo que asegura la uniformidad de la temperatura y la homogeneidad de la suspensión. Una vez alcanzado

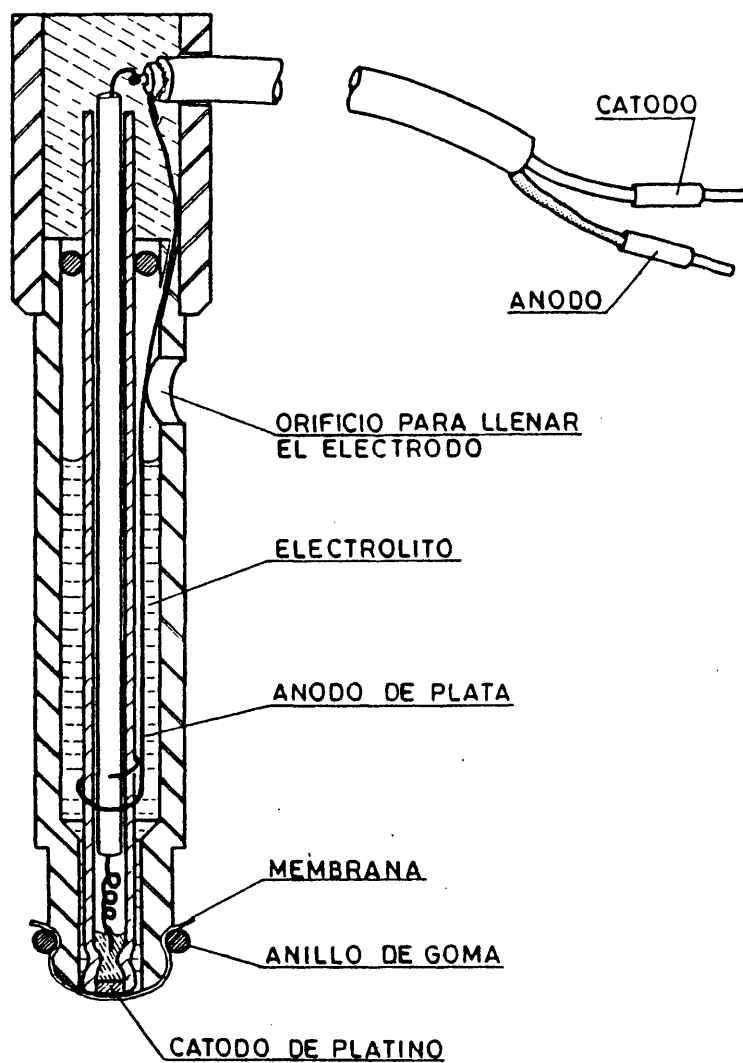
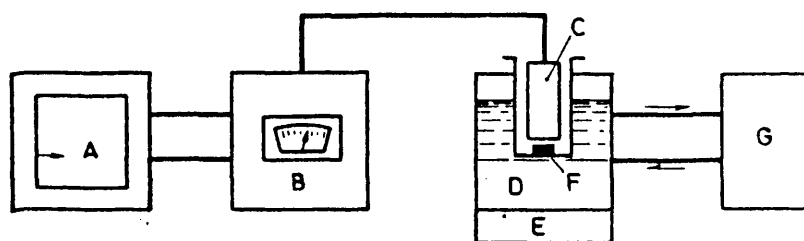


FIG.10
ELECTRODO DE OXIGENO TIPO CLARKE



- A-REGISTRO
- B-AMPLIFICADOR
- C-ELECTRODOS
- D- BAÑO TERMOSTATICO
- E-AGITADOR MAGNETICO
- F- VARILLA MAGNETICA
- G- TERMOSTATO DE CIRCULACION

FIG. 11
ESQUEMA DEL EQUIPO COMPLETO

el equilibrio, se encaja el conjunto de electrodo-portal electrodo en la cubeta de reacción y se eliminan completamente las burbujas de aire por la ranura lateral del portaelectrodo.

El sistema se ilumina con cuatro lámparas Nitro phot, Osram de 500 W cada una, situadas dos a cada lado del conjunto formado por el sistema del agitador-baño y separados del mismo por dos paneles de agua circulante que evita las radiaciones caloríficas de los focos.

Una perspectiva del equipo completo se puede apreciar en la Fig. 12.

2.4.4.3. Calibrado del equipo.

El calibrado se realizó determinando la lectura de la escala del electrodo de una muestra de agua saturada de aire a una determinada temperatura cuyo contenido de oxígeno disuelto es conocido.

La valoración del oxígeno disuelto en el agua saturada de aire para las diferentes temperaturas se realizó por el método iodométrico de Winkler (1965).

El método de Winkler se basa en la oxidación del hidróxido manganeso a mangánico en solución fuertemente alcalina. Por acidificación, y en presencia de ioduros, el hidróxido mangánico se disuelve y se libera I_2 en una cantidad equivalente al oxígeno originalmente disuelto. El I_2 libre se valora con una solución patrón de tiosulfato sódico, añadiendo almidón como indicador hacia el final de la valoración.

1 cc de tiosulfato sódico equivale a 1 mg/litro de oxígeno disuelto, cuando se ha partido de 200 cc de muestra original.



FIG. 12
EQUIPO COMPLETO DEL ELECTRODO DE OXIGENO

El procedimiento a seguir en la valoración es el siguiente: Se saturan 200 cc de una solución tampón de $\text{CO}_2\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,1 M (85:15) con aire, por medio de un aireador durante 30 minutos a las temperaturas de 10°C, 15°C, 20°C y 25°C respectivamente y se valoran por el método anteriormente citado. Los valores experimentales obtenidos figuran en la tabla IX.

Se seleccionó como temperatura de trabajo la de 25°C porque fue la que proporcionó la mejor respuesta fotosintética de las Chlorellas. A esta temperatura y 760 mm Hg, la solución tampón de $\text{CO}_2\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,1 M - (85:15) contiene 8,4 µg/cc de oxígeno disuelto.

La escala del electrodo se ajusta al 100% con 3 cc de la solución tampón en las condiciones indicadas. Una división de la escala corresponderá, por tanto, a 0,084 µg/cc de O_2 disuelto a una presión de 760 mm Hg y 25°C.

La presión atmosférica en nuestro laboratorio era de 710 mm Hg por lo que, corrigiendo los datos obtenidos para las condiciones ambientales según la fórmula:

$$S' = S \frac{P}{P'}$$

S' = Solubilidad del oxígeno a 760 mm.

S = Solubilidad del oxígeno a la presión de trabajo.

P' = Presión a 760 mm/Hg.

P = Presión en las condiciones de trabajo.

se obtiene que una división de la escala del electrodo corresponde a 0,0784 µg/cc de oxígeno disuelto en la solución tampón.



TABLA IX.- Solubilidad del oxígeno en el agua saturada de aire y en sol. tampón de $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,1 M (85:15).

Ta °C	Oxígeno disuelto en el agua mg/l a 760 mm Hg (Resultados teóricos*)	Oxígeno disuelto en solución tampón mg/l a 760 mm Hg (Resultados experimentales)
10	11,3	12
15	10,2	9,8
20	9,2	8,7
25	8,4	8,4

*(Standard Methods for the examination of Water and Waste Water, 1973).

2.4.4.4. Medida del desprendimiento de oxígeno en una suspensión de alga Chlorella pyrenoidosa.

Se tomó una cantidad suficiente de suspensión de Chlorella pyrenoidosa de la que se eliminó el medio de cultivo original por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Las algas se resuspendieron con ayuda de una torunda de algodón en un volumen calculado de solución tampón de $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,1 M (85:15) para que el contenido en clorofila total correspondiera a 20 $\mu\text{g}/\text{cc}$.

La suspensión se conservó hasta media hora antes de comenzar la experiencia en un Erlenmeyer forrado de papel de aluminio en baño de hielo.

La temperatura óptima de respuesta fotosintética del alga Chlorella, fue de 25°C.

El procedimiento seguido en cada una de las determinaciones fue el siguiente:

1) Se colocan 3 cc de solución tampón de $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,1 M (85:15), saturada de aire a 25°C en la cubeta de reacción; se conecta el agitador, se introduce el electrodo y, una vez equilibrada la temperatura, se eliminan las burbujas de aire por la ranura lateral del portaelectrodo. En estas condiciones se ajusta la escala y el registro a 0 y 100.

2) Se retira el electrodo y se vacía completamente la cubeta con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una trompa de vacío.

3) Se colocan en la cubeta 2 cc de suspensión de Chlorellas y 1 cc de agua o de la solución cuyo contenido en CMU se quiera estudiar.

4) Se introduce el electrodo, se conecta el agitador y se forra el conjunto del baño, cubeta y

electrodo con un papel negro hasta que se estabilice la temperatura.

5) Se elimina completamente el exceso de aire - por la ranura lateral del portaelectrodo.

6) Se inyecta O_2 ó N_2 , dependiendo del contenido en O_2 inicial existente en la muestra a valorar, hasta conseguir que la aguja indicadora marque el 50% de la escala, operación que se realiza por medio de una jeringa provista de una aguja hipodérmica suficientemente larga.

7) Se somete el cultivo a 6 periodos alternativos de luz y oscuridad de 5 minutos cada uno durante - los cuales la variación del contenido en O_2 de la suspensión de algas se registra gráficamente.

Un control de la experiencia se realiza siguiendo la misma técnica pero utilizando 2 cc de cultivo de Chlorellas previamente hervidas.

El valor del desprendimiento o de la absorción de O_2 por las células, se obtiene a partir del valor medio de las pendientes correspondientes a las gráficas registradas en los tres periodos de luz y oscuridad respectivamente, y este valor se refiere a su vez a la unidad de clorofila y de tiempo, teniendo en cuenta que cada unidad de la escala representa $0,0784 \mu g$ de O_2 disueltos en 1 cc de suspensión.

2.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA.

Con objeto de determinar la concentración que alcanza el CMU en hojas de plantas tratadas, se utiliza como bioensayo el efecto que produce un extracto acuoso obtenido a partir de estas hojas, sobre la A.F. (desprendimiento de O_2 a la luz) de una suspensión de *Chlorella pyrenoidosa*.

2.5.1. Preparación del extracto de hojas.

Para realizar los extractos de las hojas de plantas testigo y de las sometidas al tratamiento con CMU se procedió de la siguiente manera:

1) Se pesan 2,5 g de hojas de la especie a ensayar y se trituran en un mortero con 1/3 de su peso de arena para desgarrar los tejidos y cantidad suficiente de agua para conseguir, en total, 25 cc de extracto.

2) Se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm y se filtra la solución a través de papel de filtro - Whatman nº 1 y de Millipore de 40 μ , recogiendo el extracto en condiciones estériles en un matraz forrado con papel de aluminio, que se conserva en baño de hielo hasta media hora antes de comenzar la experiencia.

2.5.2. Ensayo del efecto del extracto.

Media hora antes de comenzar la experiencia se coloca el matraz a 25°C (temperatura a la que se va a efectuar la reacción) y, al cabo de este tiempo, se agita para homogeneizar y se toma 1 cc de extracto de hoja

que se deposita en la cubeta de reacción del electrodo, la cual contiene 2 cc de suspensión de algas en el tampón adecuado y se procede según se indica en 2.4.4.4.

2.5.3. Curvas de calibrado.

Se obtienen extractos de hojas de las plantas sin tratar de cada una de las especies a ensayar. Se prepara una serie de cubetas de reacción con 1 cc de extracto y 2 cc de suspensión de *Chlorella* a las que se añade CMU en concentraciones variables comprendidas entre 10^{-10} M y 10^{-4} M.

Los resultados de desprendimiento de oxígeno por unidad de tiempo, en cada una de las suspensiones, se refieren a la cubeta testigo que tenía 1 cc de extracto de la misma planta pero no contenía CMU, y se expresan en %.

Con los valores obtenidos (referidos al testigo) en función de las concentraciones de CMU, se obtienen las curvas de regresión, las cuales servirán para obtener la concentración de CMU existente en un extracto problema que produzca un determinado nivel de inhibición de desprendimiento de oxígeno con respecto al testigo.

2.5.4. Determinación de la concentración de CMU en la hoja.

Una vez conocida la concentración de CMU en la cubeta de reacción del electrodo de oxígeno (utilizando los datos de la curva de calibrado), se calcula la concentración de CMU en la hoja, teniendo en cuenta: el peso fresco de la hoja de partida, el contenido acuoso de ésta y el volumen final de la dilución del extracto (25 ml). En los casos en que el extracto resulta demasiado concentrado, se toma una cantidad alícuota menor de 1 cc, que se tiene en cuenta en los cálculos de la concentración final.



3. RESULTADOS

3.1. EFFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS CULTIVADAS.

3.1.1. Absorción continua de CMU.

Los resultados del efecto de la absorción continua de diversas concentraciones de CMU en solución nutritiva, por vía radicular, sobre el desarrollo de las plantas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate - durante cuatro semanas, se expresan en las tablas X (cebada), XII (avena), XIV (trigo), XVI (maíz), XVIII (judía) y XX (tomate).

Los valores, que son media de cuatro repeticiones, indican el número de hojas al final de la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª semana de tratamiento, así como los días transcurridos desde el comienzo del mismo hasta la aparición de síntomas de marchitamiento y hasta la expresión clara de letalidad en los casos en que ésta se observaba.

3.1.2. Absorción durante una semana.

El efecto del CMU administrado durante una sola semana sobre plantas que se mantuvieron posteriormente en solución nutritiva durante tres semanas más, se expresa en las tablas XI (cebada), XIII (avena), XV (trigo), XVII (maíz), XIX (judía) y XXI (tomate).

Las cifras de las tablas indican, al igual que en el apartado 3.1.1, el número de hojas que iban apareciendo al final de cada semana y los días que transcurrían desde el comienzo del tratamiento hasta la aparición de síntomas de marchitamiento.

TABLA X.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de cebada a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad). Edad inicial de las plántulas: 14 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª				
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.			
0	2	0	6	0,166	11,5	0,112	19	0,135	-	-	
10 ⁻¹²	2	0	5	0,162	9	0,090	14,5	0,143	-	-	
10 ⁻¹¹	2	0	5,5	0,105	9,25	0,054	13,5	0,095	-	-	
10 ⁻¹⁰	2	0	6,25	0,080	9	0,090	14,75	0,115	-	-	
10 ⁻⁹	2	0	6	0,136	11	0,014	20	0,108	25	-	
10 ⁻⁸	2	0	6	0,136	10	0,081	12,5	0,089	15	-	
10 ⁻⁷	2	0	6	0,192	8	0,102	10,5	0,122	9	18	
10 ⁻⁶	2	0	3,75	0,133	-	-	-	-	7	14	
10 ⁻⁵	2	0	-	-	-	-	-	-	3	8	
10 ⁻⁴	2	0	-	-	-	-	-	-	1	3	

TABLA XI.— Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de cebada a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} ; media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Edad inicial de las plántulas: 14 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª				
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.			
0	2	0	6	0,136	11,75	0,145	19	0,135	-	-	
10 ⁻¹²	2	0	6	0,136	11,75	0,145	17	0,048	-	-	
10 ⁻¹¹	2	0	5,25	0,095	8	0,102	18,5	0,069	-	-	
10 ⁻¹⁰	2	0	5	0,163	8	0,102	19	0,135	-	-	
10 ⁻⁹	2	0	5	0,163	8,25	0,116	16,75	0,102	-	-	
10 ⁻⁸	2	0	5,75	0,166	11,75	0,145	19,75	0,086	28	-	
10 ⁻⁷	2	0	5	0,163	8	0,102	12,75	0,134	18	24	
10 ⁻⁶	2	0	4,75	0,201	6,75	0,141	8,25	0,116	15	18	
10 ⁻⁵	2	0	-	-	-	-	-	-	3	8	
10 ⁻⁴	2	0	-	-	-	-	-	-	1	3	

TABLA XII.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de avena a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).
Edad inicial de las plántulas: 14 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª		Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	\bar{X}	c.v.	\bar{X}	c.v.	\bar{X}	c.v.	\bar{X}	c.v.			
0	2	0	3,75	0,255	5,5	0,104	8,5	0,067	-	-	-
10 ⁻¹²	2	0	3,5	0,164	5,5	0,104	8,5	0,067	-	-	-
10 ⁻¹¹	2	0	3,5	0,164	5,25	0,095	8,25	0,116	-	-	-
10 ⁻¹⁰	2	0	3,25	0,153	5,25	0,095	8	0,102	-	-	-
10 ⁻⁹	2	0	3,5	0,164	5,25	0,095	6,75	0,141	28	28	-
10 ⁻⁸	2	0	3,25	0,153	5,5	0,103	6	0,136	25	25	-
10 ⁻⁷	2	0	3	0,272	5	0,163	5	0,163	17	17	28
10 ⁻⁶	2	0	-	-	-	-	-	-	13	13	17
10 ⁻⁵	2	0	-	-	-	-	-	-	10	10	14
10 ⁻⁴	2	0	-	-	-	-	-	-	6	6	9

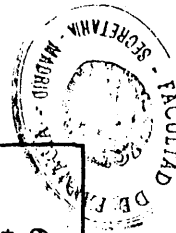


TABLA XIII.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de avena a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (x: media; c.v.: coef. variabilidad). Edad inicial de las plántulas: 14 días.

TABLA XIV.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plantas de trigo a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).
 Edad inicial de las plántulas: 14 días.

[illegible]

TABLA XV.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de trigo a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad). Edad inicial de las plántulas: 14 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª					
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.				
0	2	0	4	0,204	6	0,136	8,25	0,116	-	-	-	
10 ⁻¹²	2	0	4,75	0,201	6	0,136	8,25	0,116	-	-	-	
10 ⁻¹¹	2	0	4,5	0,128	6,25	0,080	8	0,102	-	-	-	
10 ⁻¹⁰	2	0	4,5	0,128	6,25	0,080	8,25	0,116	-	-	-	
10 ⁻⁹	2	0	4,5	0,128	6,75	0,141	8,5	0,067	28	-	-	
10 ⁻⁸	2	0	4	0,204	6	0,136	7,75	0,123	20	-	-	
10 ⁻⁷	2	0	4	0,204	5,5	0,104	-	-	21	-	-	
10 ⁻⁶	2	0	3,75	0,133	-	-	-	-	18	28	-	
10 ⁻⁵	2	0	-	-	-	-	-	-	5	12	-	
10 ⁻⁴	2	0	-	-	-	-	-	-	4	8	-	

TABLA XVI.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de maíz a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).
 Edad inicial de las plántulas: 21 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:						Aparición de síntomas de marchita- miento	Expresión de la letalidad	
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª		
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	
0	4	0	6,25	0,080	8,25	0,116	8,5	0,067	-
10 ⁻¹²	4	0	6	0,136	8	0,102	8,25	0,116	-
10 ⁻¹¹	4	0	6	0,136	8	0,102	8,25	0,116	-
10 ⁻¹⁰	4	0	6,25	0,080	8,25	0,116	8,5	0,067	-
10 ⁻⁹	4	0	6	0,136	6,75	0,141	7	0,116	27
10 ⁻⁸	4	0	5,75	0,166	6,5	0,088	6,5	0,088	21
10 ⁻⁷	4	0	5,75	0,166	6,25	0,080	6,5	0,088	17
10 ⁻⁶	4	0	-	-	-	-	-	-	11
10 ⁻⁵	4	0	-	-	-	-	-	-	7
10 ⁻⁴	4	0	-	-	-	-	-	-	1
									28
									18
									11
									3

TABLA XVII.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de maíz a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coef. de variabilidad). Edad inicial de las plántulas: 21 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª					
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.				
0	4	0	6,25	0,080	8,25	0,116	8,5	0,067	-	-	-	
10 ⁻¹²	4	0	6	0,136	8	0,102	8,25	0,116	-	-	-	
10 ⁻¹¹	4	0	6	0,136	8	0,102	8,25	0,116	-	-	-	
10 ⁻¹⁰	4	0	6,25	0,080	8,25	0,116	8,5	0,067	-	-	-	
10 ⁻⁹	4	0	6,25	0,080	8	0,102	8,5	0,067	-	-	-	
10 ⁻⁸	4	0	6	0,136	8	0,102	8	0,102	27	-	-	
10 ⁻⁷	4	0	6	0,136	7	0,116	7	0,116	21	-	-	
10 ⁻⁶	4	0	5,75	0,166	6,25	0,080	6,5	0,088	14	26	26	
10 ⁻⁵	4	0	-	-	-	-	-	-	7	11	11	
10 ⁻⁴	4	0	-	-	-	-	-	-	1	3	3	

TABLA XIX.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de judía a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.:coef.variabilidad) Edad inicial de las plántulas: 28 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª				
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.			
0	6	0	9,5	0,060	19,5	0,029	24,5	0,023	-	-	
10 ⁻¹²	6	0	9,5	0,060	19,5	0,029	23,5	0,023	-	-	
10 ⁻¹¹	6	0	9,25	0,054	19	0,135	24,5	0,023	-	-	
10 ⁻¹⁰	6	0	9,5	0,060	19	0,135	22,75	0,023	-	-	
10 ⁻⁹	6	0	9,25	0,054	19	0,135	23,5	0,023	28	-	
10 ⁻⁸	6	0	9,25	0,054	19	0,135	24,25	0,020	25	-	
10 ⁻⁷	6	0	9	0,090	18,75	0,051	22,25	0,020	21	22	
10 ⁻⁶	6	0	9	0,090	12,75	0,134	15	0,054	8	13	
10 ⁻⁵	6	0	-	-	-	-	-	-	3	6	
10 ⁻⁴	6	0	-	-	-	-	-	-	1	4	

TABLA XX.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de tomate a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los valores son medias de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad)
Edad inicial de las plántulas: 42 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento		Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª		Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.			
0	12	0	40,5	0,014	63,5	0,030	68	0,012	-	-	
10 ⁻¹²	12	0	39,5	0,032	64	0,067	68,5	0,018	-	-	
10 ⁻¹¹	12	0	40,75	0,023	65,5	0,019	68,25	0,014	-	-	
10 ⁻¹⁰	12	0	40,25	0,012	63,5	0,020	68,25	0,014	-	-	
10 ⁻⁹	12	0	38	0,037	60	0,013	68	0,012	28	-	
10 ⁻⁸	12	0	36,5	0,035	55,5	0,034	60	0,013	21	-	
10 ⁻⁷	12	0	30	0,027	50,5	0,049	52,75	0,028	11	21	
10 ⁻⁶	12	0	-	-	-	-	-	-	4	8	
10 ⁻⁵	12	0	-	-	-	-	-	-	1	4	
10 ⁻⁴	12	0	-	-	-	-	-	-	1	2	

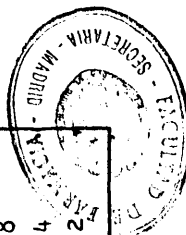


TABLA XXI.- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de tomate a lo largo de cuatro semanas. Las plántulas estuvieron en solución nutritiva con diversas concentraciones de CMU durante la primera semana solamente y las tres restantes en solución nutritiva sin CMU. Los valores son media de cuatro repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad). Edad inicial de las plántulas: 42 días.

Concentración de CMU en la solución (M)	Número de hojas al final de la:								Aparición de síntomas de marchita- miento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Días transcurridos desde el comienzo del tratamiento	Expresión de la letalidad
	Semana 1ª		Semana 2ª		Semana 3ª		Semana 4ª					
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.				
0	12	0	40,5	0,014	63,5	0,030	68	0,012	-	-	-	
10 ⁻¹²	12	0	40	0,020	64	0,067	69	0,011	-	-	-	
10 ⁻¹¹	12	0	40,5	0,031	64	0,067	70,5	0,018	-	-	-	
10 ⁻¹⁰	12	0	38	0,037	65	0,012	69	0,011	-	-	-	
10 ⁻⁹	12	0	37,5	0,034	64	0,067	68	0,012	-	-	-	
10 ⁻⁸	12	0	37,5	0,034	63,5	0,020	67,75	0,014	27	25	8	
10 ⁻⁷	12	0	34	0,024	60	0,013	63	0,012	14	8	4	
10 ⁻⁶	12	0	30	0,027	-	-	-	-	4	4	2	
10 ⁻⁵	12	0	-	-	-	-	-	-	1	1	-	
10 ⁻⁴	12	0	-	-	-	-	-	-	1	1	-	

3.2. EFFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA
DE LAS HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS.

3.2.1. Concentración de CMU en las hojas.

La cantidad de CMU absorbida radicularmente por cada una de las especies vegetales ensayadas, a las 24 horas y 7 días de absorción, se determinó por contaje del CMU-¹⁴C incorporado a cada planta.

En las tablas XXII y XXIII se indican los valores obtenidos en cada experiencia, que son media de - cuatro repeticiones, para las diversas especies vegetales después de 24 horas y 7 días de absorción respectivamente.

Estos valores se representan gráficamente en las figuras 13 (cebada), 14 (avena), 15 (trigo), 16 (maíz), 17 (judía) y 18 (tomate).

En la tabla XXIV se expresan los valores de las concentraciones relativas alcanzadas por el CMU en las hojas de las diversas plantas tratadas con respecto a la concentración de CMU que existía inicialmente en la solución nutritiva después de 24 horas y 7 días de absorción radicular.

Estos valores se representan gráficamente en las figuras 19 (24 horas) y 20 (7 días).

TABLA XIII.- Concentración de CHU en las hojas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate después de 24 horas de absorción regular en soluciones con diferentes concentraciones de CHU (Los valores son media de cuatro repeticiones y están obtenidos teniendo en cuenta la cantidad de CHU y el contenido acuoso determinado en cada muestra (% media; c.v.: coeficiente de variabilidad))

Concentr. molar del CHU en la sol. nutriente (mmol/ml)	Concentración molar de CHU en la hoja (mmol/ml)											
	Cebada		Avena		Trigo		Maíz		Judía		Tomate	
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.
10^{-7}	$2,48 \times 10^{-6}$	0,50	$3,98 \times 10^{-6}$	0,41	$5,54 \times 10^{-6}$	0,045	$3,01 \times 10^{-6}$	0,80	$1,05 \times 10^{-6}$	0,05	$2,03 \times 10^{-6}$	0,24
10^{-6}	$1,53 \times 10^{-5}$	0,38	$1,86 \times 10^{-5}$	0,25	$3,62 \times 10^{-5}$	0,074	$6,51 \times 10^{-6}$	0,61	$6,28 \times 10^{-6}$	0,37	$1,85 \times 10^{-5}$	0,27
10^{-5}	$2,71 \times 10^{-5}$	0,20	$1,20 \times 10^{-4}$	0,12	$1,02 \times 10^{-4}$	0,36	$1,49 \times 10^{-5}$	0,13	$2,44 \times 10^{-5}$	0,14	$8,10 \times 10^{-5}$	0,36
10^{-4}	$8,50 \times 10^{-5}$	0,32	$5,79 \times 10^{-4}$	0,15	$3,55 \times 10^{-4}$	0,39	$8,71 \times 10^{-5}$	0,047	$1,93 \times 10^{-4}$	0,15	$1,83 \times 10^{-4}$	0,14

TABLA XXIII.- Concentración de CHU en las hojas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y tomate después de 7 días de absorción
 radicular en soluciones con diferentes concentraciones de CHU (Los valores son media de cuatro repeticiones y
 están obtenidos teniendo en cuenta la cantidad de CHU y el contenido acuoso determinado en cada muestra (\bar{x} : media;
 o.v.: coeficiente de variabilidad)

Concentr. molar del CHU en la sol. nutrit.	Concentración molar de CHU en la hoja (mmol/ml)											
	Cebada		Avena		Trigo		Maíz		Judía		Tomate	
	\bar{x}	o.v.	\bar{x}	o.v.	\bar{x}	o.v.	\bar{x}	o.v.	\bar{x}	o.v.	\bar{x}	o.v.
10^{-7}	5.67×10^{-6}	0.29	4.55×10^{-6}	0.32	6.59×10^{-6}	0.29	4.86×10^{-6}	0.50	2.56×10^{-6}	0.19	2.58×10^{-5}	0.47
10^{-6}	2.96×10^{-5}	0.22	2.38×10^{-5}	0.25	8.95×10^{-5}	0.26	9.59×10^{-6}	0.18	1.49×10^{-5}	0.21	1.95×10^{-5}	0.47
10^{-5}	1.05×10^{-4}	0.44	1.38×10^{-4}	0.38	1.55×10^{-4}	0.26	1.54×10^{-5}	0.58	9.96×10^{-5}	0.15	1.26×10^{-4}	0.52
10^{-4}	6.86×10^{-4}	0.48	1.87×10^{-3}	0.50	9.29×10^{-4}	0.85	0.88×10^{-4}	0.61	2.67×10^{-4}	0.21	9.82×10^{-4}	0.31

TABLA XXIV.- Relación de la concentración de CMU alcanzada en las hojas de las diferentes plantas respecto a la concentración existente inicialmente en la solución nutritiva.

Conc. de CMU en la solución mmol/ml	Concentración relativa de CMU en la hoja (CMU en hoja)/(CMU en sol.nutritiva)											
	Cebada		Avena		Trigo		Maíz		Judía		Tomate	
	24 h	7 días	24 h	7 días	24 h	7 días	24 h	7 días	24 h	7 días	24 h	7 días
10 ⁻⁷	24,87	56,7	39,8	45,5	54	65,9	30,16	48,6	10,5	25,6	20,32	25,8
10 ⁻⁶	15,37	29,6	18,6	23,8	36,2	39,5	6,51	9,59	6,0	14,9	18,5	19,3
10 ⁻⁵	2,71	10,30	12,05	13,8	10,25	15,5	1,49	1,54	2,44	9,96	8,10	12,6
10 ⁻⁴	0,85	6,86	5,79	10,7	3,55	9,29	0,871	0,88	1,93	2,67	1,83	9,82



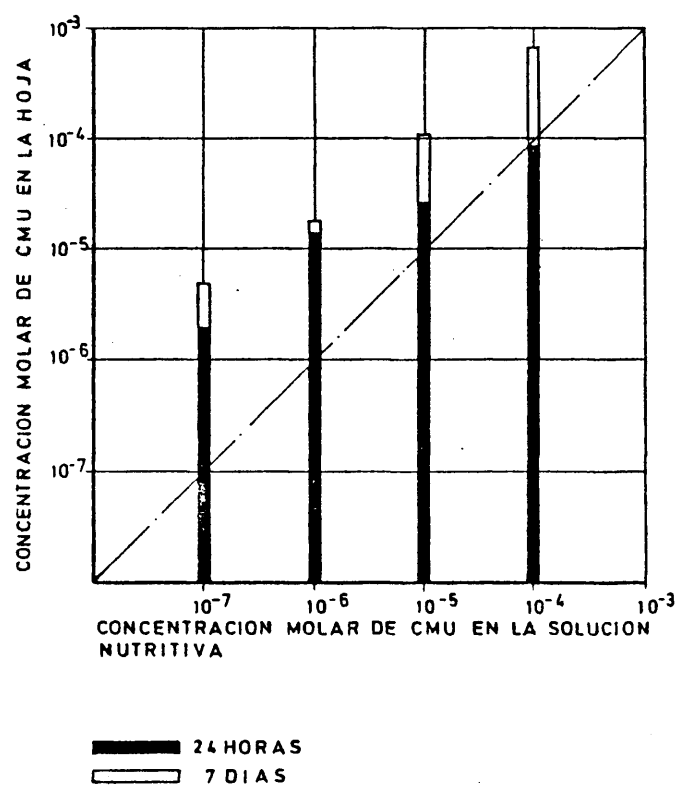


FIG.13
HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU
EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE CEBADA QUE LO
ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE
24 HORAS Y 7 DIAS

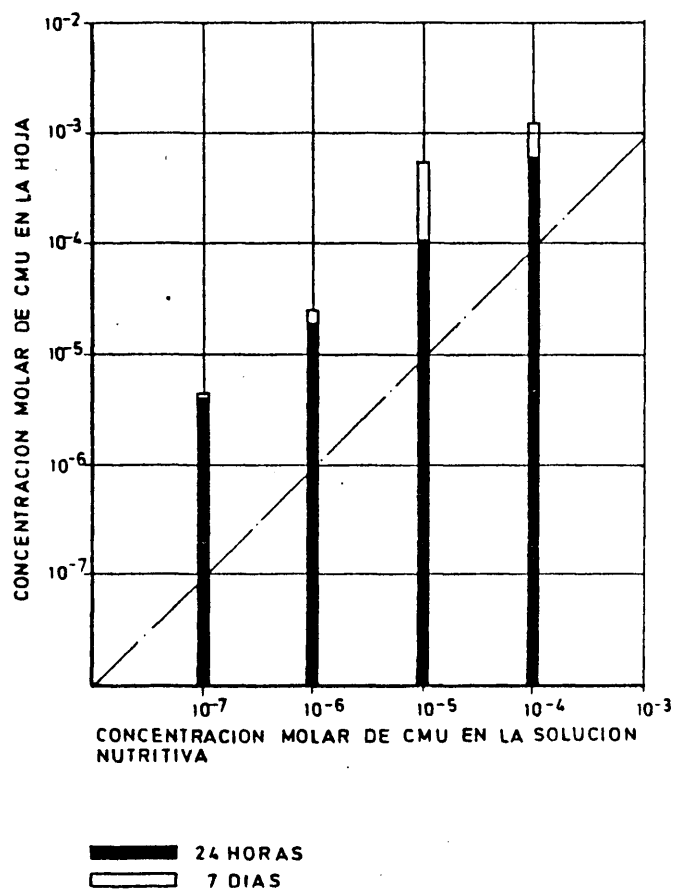


FIG. 14
HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU
EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE AVENA QUE LO
ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE
24 HORAS Y 7 DIAS

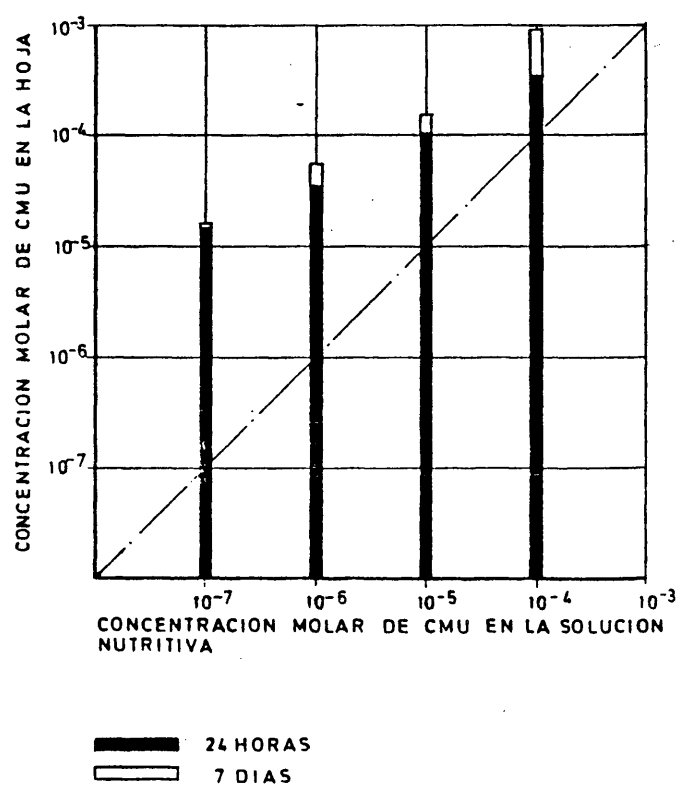


FIG. 15
HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU
EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE TRIGO QUE LO
ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE
24 HORAS Y 7 DIAS

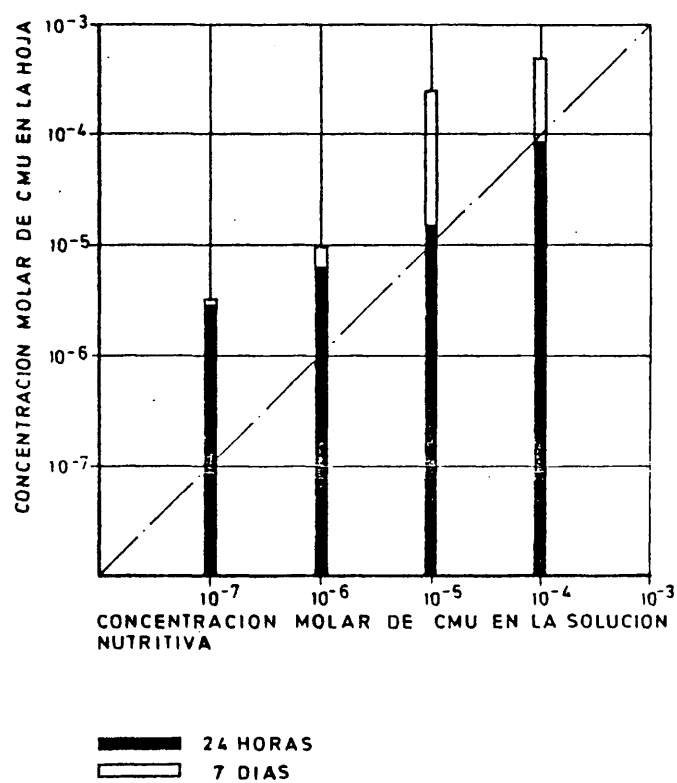


FIG. 16
HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU
EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE MAIZ QUE LO
ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE
24 HORAS Y 7 DIAS

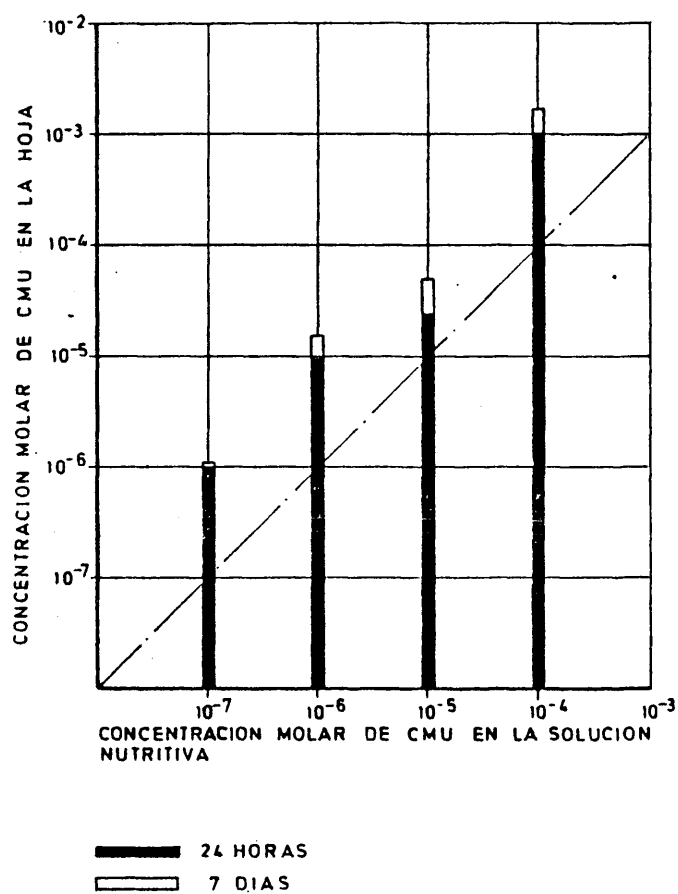


FIG.17
 HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU
 EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE JUDIA QUE LO
 ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE
 24 HORAS Y 7 DIAS

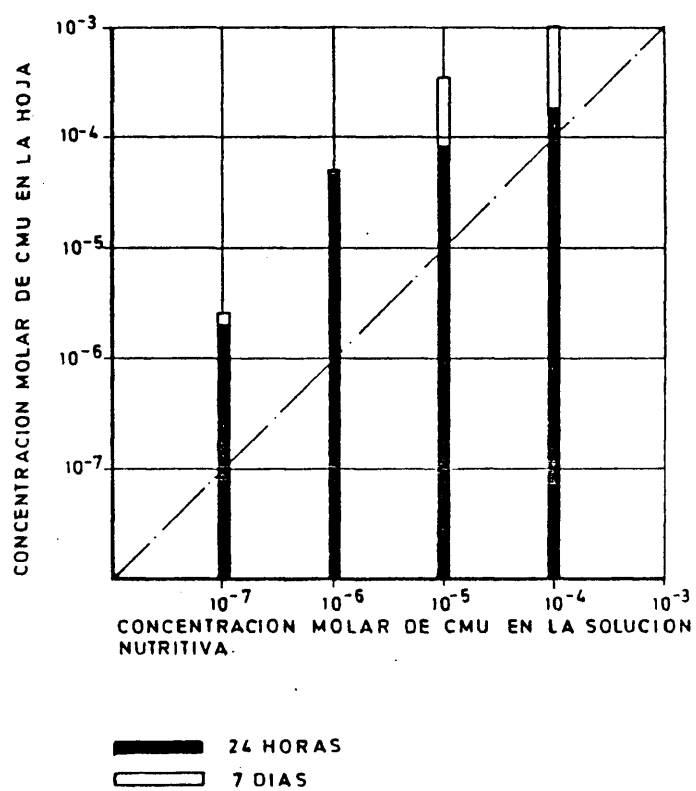
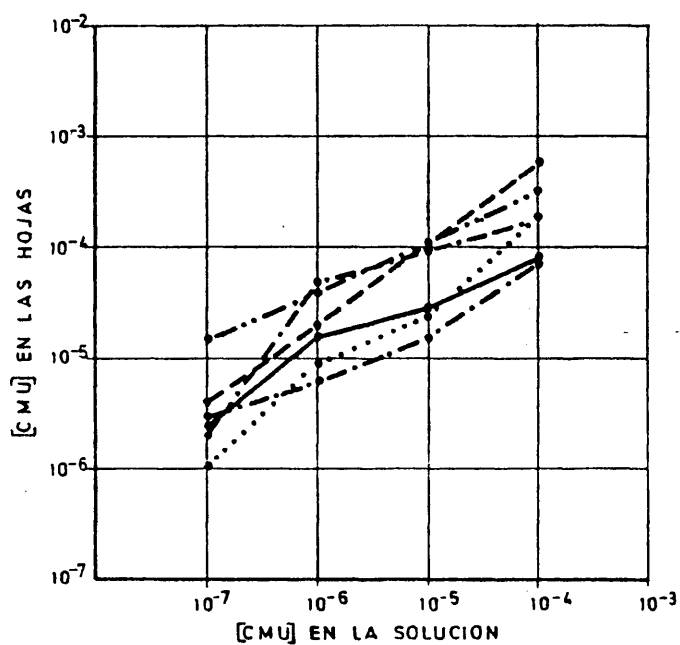


FIG.18

HISTOGRAMA DE LAS CONCENTRACIONES DE CMU EN LAS HOJAS DE PLANTAS DE TOMATE QUE LO ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE 24 HORAS Y 7 DIAS



— CEBADA
 - - - AVENA
 JUDIA
 - · - · - MAIZ
 - · - · - TRIGO
 - · - · - TOMATE

FIG. 19
 RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE CMU EN LA
 SOLUCION Y LA CONCENTRACION DE CMU ALCANZADO
 EN LAS HOJAS DE LAS DIFERENTES PLANTAS DESPUES
 DE ABSORBERLO RADICULARMENTE DURANTE 24 HORAS

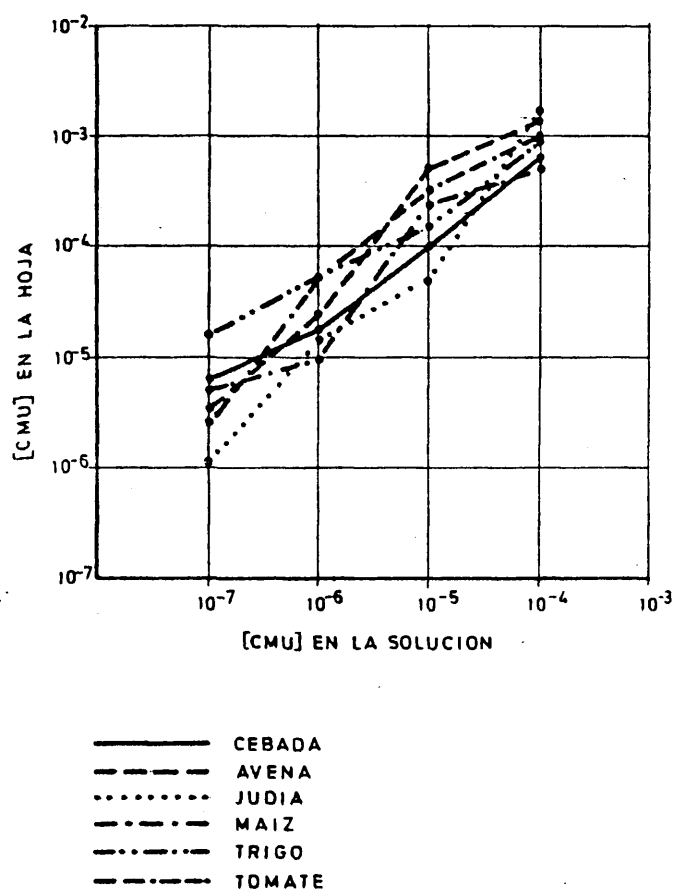


FIG. 20
RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE CMU EN LA SOLUCION Y LA CONCENTRACION DE CMU ALCANZADO EN LAS HOJAS DE LAS DIFERENTES PLANTAS DESPUES DE ABSORBERLO RADICULARMENTE DURANTE 7 DIAS

3.2.2. Asimilación del $^{14}\text{CO}_2$.

La acción de distintas concentraciones de CMU sobre la carboxilación, se estudió por determinación del $^{14}\text{CO}_2$ asimilado por las plantas de las diversas especies vegetales que previamente habían absorbido por vía radicular CMU a 4 concentraciones diferentes durante 24 horas y 7 días, según se describe en el apartado 2.2.2.

Se utilizaron dos plantas de cada una de las especies vegetales para cada concentración de CMU, siendo los resultados media de cuatro determinaciones.

En las tablas XXV (24 horas de absorción) y XXVI (7 días de absorción) se expresan los valores medios obtenidos.

La relación existente entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de las diferentes especies vegetales y la actividad fotosintética de la misma después de 24 horas y 7 días de absorción radicular, se expresa en las tablas XXVII (cebada), XXVIII (avena), XXIX (trigo), XXX (maíz), XXXI (judía) y XXXII (tomate) y se representa gráficamente en las figuras 21 (24 horas) y 22 (7 días).

Los valores de la concentración de CMU en las hojas se obtienen a partir de la tabla XXII (24 horas) y XXIII (7 días) y los de la A.F. relativa a partir de las tablas XXV (24 horas) y XXVI (7 días).

TABLA XXV.- Efecto de la absorción radicular de CMU durante 24 horas sobre la actividad fotosintética de las hojas de las diferentes plantas tratadas.
Los valores (en %) en cada especie están referidos a la actividad fotosintética del testigo no tratado y son media de 4 repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. del CMU en la solución mmol/ml	Actividad fotosintética relativa (%)											
	Cebada		Avena		Trigo		Maíz		Judía		Tomate	
	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.	\bar{x}	c.v.
0	100	0,078	100	0,10	100	0,10	100	0,11	100	0,07	100	0,07
10^{-7}	80,61	0,13	82,44	0,06	87,4	0,08	72,22	0,09	83,81	0,08	84,1	0,06
10^{-6}	47,87	0,10	52,33	0,09	38,20	0,07	24,05	0,10	56,88	0,12	60,3	0,05
10^{-5}	6,12	0,10	3,32	0,12	2,81	0,10	5,9	0,12	15,05	0,11	17,69	0,09
10^{-4}	0,51	0,051	0,76	0,28	0,12	0,07	0,9	0,12	0,30	0,09	0,67	0,08

TABLA XXVII.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de cebada y la actividad fotosintética relativa de la misma.

24 h			7 días		
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)		
$2,48 \times 10^{-6}$	80,61	$5,67 \times 10^{-6}$	33,92		
$1,53 \times 10^{-5}$	47,87	$2,96 \times 10^{-5}$	2,85		
$2,71 \times 10^{-5}$	6,12	-	-		
$8,50 \times 10^{-5}$	0,51	-	-		

TABLA XXVIII.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de avena y la actividad fotosintética relativa de la misma.

24 h			7 días	
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	
$3,98 \times 10^{-6}$	82,44	$4,55 \times 10^{-6}$	61,34	
$1,86 \times 10^{-5}$	52,33	$2,38 \times 10^{-5}$	10,2	
$1,20 \times 10^{-4}$	3,32	-	-	
$5,79 \times 10^{-4}$	0,76	-	-	

TABLA XXIX.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de trigo y la actividad fotosintética relativa de la misma.

24 h		7 días	
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)
$5,54 \times 10^{-6}$	87,40	$6,59 \times 10^{-6}$	75,48
$3,62 \times 10^{-5}$	38,20	$8,95 \times 10^{-5}$	15,48
$1,02 \times 10^{-4}$	2,81	-	-
$3,55 \times 10^{-4}$	0,12	-	-

TABLA XXX.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de maíz y la actividad fotosintética relativa de la misma.

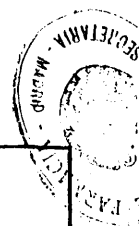
24 h		7 días	
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)
$3,01 \times 10^{-6}$	72,22	$4,86 \times 10^{-6}$	40,29
$6,51 \times 10^{-6}$	24,05	$9,59 \times 10^{-6}$	9,60
$1,49 \times 10^{-5}$	5,90	-	-
$8,71 \times 10^{-5}$	0,90	-	-

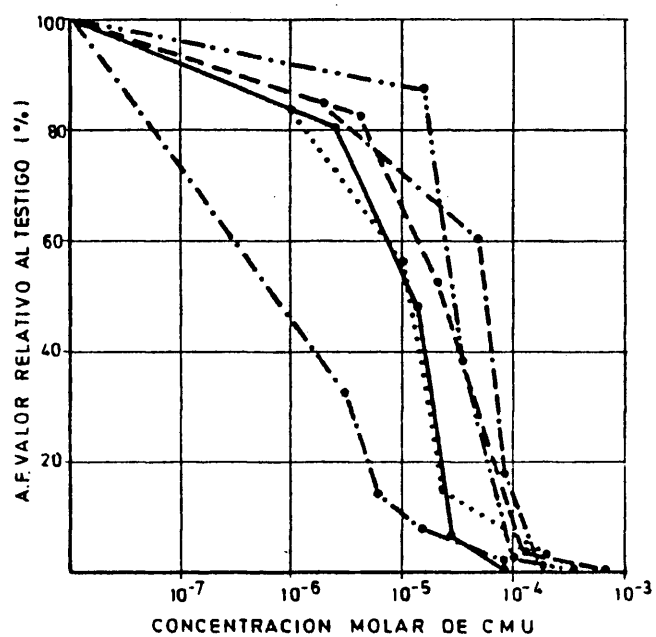
TABLA XXXI.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de judía y la actividad fotosintética relativa de la misma.

24 h		7 días	
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)
$1,05 \times 10^{-6}$	83,81	$2,56 \times 10^{-6}$	66,87
$6,28 \times 10^{-6}$	56,88	$5,49 \times 10^{-5}$	2,99
$2,44 \times 10^{-5}$	15,05	-	-
$1,93 \times 10^{-4}$	0,30	-	-

TABLA XXXII.- Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de tomate y la actividad fotosintética relativa de la misma.

24 h		7 días	
(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)	(CMU en la hoja) (mmol/ml)	A.F. relativa (%)
$2,03 \times 10^{-6}$	84,1	$2,58 \times 10^{-5}$	46,32
$1,85 \times 10^{-5}$	60,3	$9,93 \times 10^{-5}$	3,13
$8,10 \times 10^{-5}$	17,69	-	-
$1,83 \times 10^{-4}$	0,67	-	-





— CEBADA
 - - - AVENA
 JUDIA
 - · - · - MAIZ
 · - - - - TRIGO
 - · - - - TOMATE

FIG. 21
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ALCANZADA POR EL
 CMU EN LAS HOJAS DE DIFERENTES VEGETALES QUE LO
 ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE 24 HORAS,
 SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE ESTAS. VALORES
 RELATIVOS AL TESTIGO.

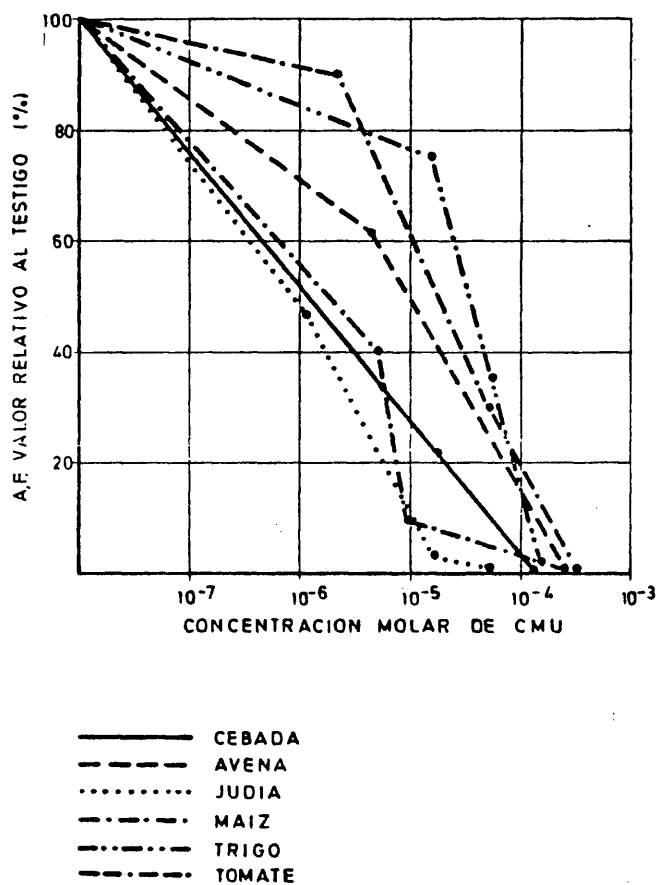


FIG. 22

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ALCANZADA POR EL CMU EN LAS HOJAS DE DIFERENTES ESPECIES VEGETALES QUE LA ABSORBIERON RADICULARMENTE DURANTE 7 DIAS, SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE ESTAS. VALORES RELATIVOS AL TESTIGO

3.3. EFFECTO DEL CMU SOBRE LA REACCION DE HILL EN CLORO-
PLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE PLANTAS CULTIVADAS.

3.3.1. Relación superficie/peso de hoja y contenido en
clorofila.

En la tabla XXXIII se expresa el valor medio de la relación superficie/peso realizada en hojas de 10 plantas de cada una de las especies estudiadas, así como el valor medio obtenido en la determinación de la clorofila total en las mismas, expresada en mg/cm^2 de hoja. También se indica el contenido en clorofila expresado en mg/ml .

A partir de los valores obtenidos en la determinación de la clorofila total en hojas de plantas frescas y en la solución de cloroplastos, se ha calculado la superficie foliar equivalente para cada especie vegetal que corresponde a los cloroplastos contenidos en cada cubeta de reacción (0,5 ml de suspensión inicial).

3.3.2. Curva de calibrado de la relación DPIP oxidado/
D.O.540.

En la tabla XXXIV se expresan los valores obtenidos en la curva de calibrado en la que se relaciona la concentración de DPIP oxidado con la D.O. leída a 540 nm.

Estos valores satisfacen a la ley de Beer-Lambert y, por tanto:

$$D.O. = K.C$$

El valor de K obtenido mediante ajuste por mínimos cuadrados fue 9,5141 unidades de densidad óptica por micromol de DPIP en forma oxidada.

TABLA XXXIII.- Contenido en clorofila de las hojas de las diferentes especies ensayadas y su relación con el contenido en clorofila de la suspensión de cloroplastos en el estudio de la reacción de Hill.

Especie vegetal	Relación superficie / peso (cm ² / g)	Contenido en clorofila total (mg/cm ²)	Cloroplastos en Reacción de Hill	
			Contenido en clorofila en la cubeta de reacción (mg)	Superficie foliar equivalente (cm ²)
Cebada	63,67	0,03464	0,159	4,59
Avena	58,11	0,02453	0,159	6,48
Trigo	66,89	0,02379	0,159	6,68
Maiz	66,54	0,04392	0,159	3,62
Judía	62,84	0,05481	0,159	2,90
Tomate	90,62	0,02429	0,159	6,45



TABLA XXXIV.- Curva de calibrado del DPIP oxidado.
Los valores expresan unidades de D.O. a
540 nm. (\bar{x} : media de cinco repeticio-
nes; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de DPIP ox. en la cubeta de reacción ($\mu\text{mol} / \text{ml}$)	D.O.	
	\bar{x}	c.v.
0,0062	0,063	0,4065
0,0111	0,101	0,1821
0,0166	0,141	0,0825
0,0222	0,188	0,0843
0,0277	0,238	0,0721
0,0333	0,299	0,1038
0,0388	0,350	0,0673
0,0444	0,401	0,0323
0,0500	0,439	0,0251
0,0555	0,499	0,0213

Ajuste: $\text{D.O.} = K \times \text{DPIP ox.}$

K: 9,5141

r: 0,998

$\text{D.O.} = 9,5141 (\text{DPIP ox.})$

3.3.3. Condiciones de la reacción.

La capacidad fotorreductora de los cloroplastos se estudió según las condiciones de reacción que se detallan en el apartado 2.3.4.

Se utilizaron 5 concentraciones diferentes de CMU, efectuándose dos lecturas en el colorímetro a 540 nm por cada tubo, una inicial y otra después de un minuto de iluminación.

La cantidad de DPIP reducido en cada caso se obtiene sustituyendo el incremento de densidad óptica en la expresión:

$$\text{DPIP reducido} = \frac{\Delta DO}{9,5141}$$

La experiencia se repitió 5 veces para cada concentración. Los resultados obtenidos, valores medios y valores relativos al testigo, se pueden observar en las tablas XXXV (cebada), XXXVI (avena), XXXVII (trigo), - XXXVIII (maíz), XXXIX (judía) y XL (tomate).

Por cada mol de DPIP reducido en la reacción de Hill se desprenden 0,5 moles de oxígeno, lo que nos permite determinar los micromoles de oxígeno desprendidos en cada tubo de reacción durante el minuto que dura la iluminación.

Dado que los 0,5 ml de la solución de cloroplastos incorporados a la reacción se pueden correlacionar con la superficie de hoja fresca a que equivalen para cada especie vegetal, los resultados se pueden expresar como micromoles de oxígeno desprendidos por hora y por cm² de hoja fresca.

TABLA XXXV.- Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de cebada en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	Δ D.O.		Δ (DPIP red) $\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol O}_2$ (mg clorofila) $^{-1}$ min^{-1}	Actividad fotosintética		
	\bar{x}	c.v.			$\mu\text{mol O}_2$ $\text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$	Valor relativo al testigo %	
0	0,284	0,010	0,0298	0,4264	0,8870	100	
$1,46 \times 10^{-8}$	0,257	0,042	0,0270	0,3859	0,8026	90,94	
$1,46 \times 10^{-7}$	0,252	0,013	0,0265	0,3783	0,7870	88,73	
$1,46 \times 10^{-6}$	0,208	0,086	0,0218	0,3123	0,6496	73,24	
$1,46 \times 10^{-5}$	0,129	0,008	0,0135	0,1937	0,4029	45,42	
$1,46 \times 10^{-4}$	0,017	0,047	0,00178	0,0255	0,0531	5,98	

TABLA XXXVI.- Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de avena en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	Δ D.O.		Δ (DPIP red) $\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol O}_2$ (mg clorofila) $^{-1}$ min^{-1}	Actividad fotosintética	
	\bar{x}	c.v.			$\mu\text{mol O}_2$ $\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Valor relativo al testigo %
0	0,283	0,001	0,02975	0,4249	0,8838	100
$1,46 \times 10^{-8}$	0,257	0,003	0,02702	0,3859	0,8026	90,82
$1,46 \times 10^{-7}$	0,228	0,001	0,02397	0,3422	0,7119	80,55
$1,46 \times 10^{-6}$	0,165	0,004	0,01735	0,2477	0,5153	58,30
$1,46 \times 10^{-5}$	0,090	0,001	0,00946	0,1351	0,2811	31,80
$1,46 \times 10^{-4}$	0,017	0,001	0,00178	0,0255	0,0530	6,00

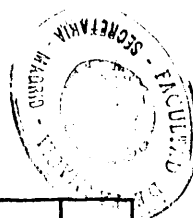


TABLA XXXVII.- Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de trigo en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	$\Delta D.O.$		$\Delta(DPIP \text{ red})$ $\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol O}_2$ (mg clorofila) $^{-1}$ min^{-1}	Actividad fotosintética		
	\bar{x}	c.v.			$\mu\text{mol O}_2$ $\text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$	Valor relativo al testigo %	
0	0,252	0,015	0,026	0,3781	0,7870	100	
$1,46 \times 10^{-8}$	0,216	0,023	0,022	0,3243	0,6746	85,72	
$1,46 \times 10^{-7}$	0,205	0,004	0,021	0,3078	0,6402	81,35	
$1,46 \times 10^{-6}$	0,170	0,037	0,017	0,2552	0,5309	67,46	
$1,46 \times 10^{-5}$	0,090	0,034	0,009	0,1351	0,2811	35,71	
$1,46 \times 10^{-4}$	0,017	0,064	0,001	0,0255	0,0531	6,74	

TABLA XXXVIII.- Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de maíz en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	Δ D.O.		Δ (DPIP red) "mol/ml	μ mol O ₂ (mg clorofila) ⁻¹ min ⁻¹	Actividad fotosintética	
	\bar{x}	c.v.			μ mol O ₂ cm ⁻² h ⁻¹	Valor relativo al testigo %
0	0,210	0,019	0,0221	0,3153	0,6558	100
$1,46 \times 10^{-8}$	0,192	0,062	0,0201	0,2883	0,5996	91,44
$1,46 \times 10^{-7}$	0,181	0,015	0,0190	0,2718	0,5653	86,20
$1,46 \times 10^{-6}$	0,123	0,008	0,0129	0,1847	0,3841	58,58
$1,46 \times 10^{-5}$	0,076	0,004	0,0079	0,1141	0,2373	36,19
$1,46 \times 10^{-4}$	0,008	0,075	0,0008	0,0120	0,0249	3,80

TABLA XXXIX.-Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de judía en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	$\Delta D.O.$		$\Delta(DPIP \text{ red})$ $\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol O}_2$ (mg clorofila) $^{-1}$ min^{-1}	Actividad fotosintética	
	\bar{x}	c.v.			$\mu\text{mol O}_2$ $\text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$	Valor relativo al testigo %
0	0,2752	0,0254	0,0289	0,4132	0,8595	100
$1,46 \times 10^{-8}$	0,2568	0,0350	0,0270	0,3856	0,8020	93,31
$1,46 \times 10^{-7}$	0,2380	0,0294	0,0250	0,3573	0,7433	86,48
$1,46 \times 10^{-6}$	0,1530	0,0209	0,0160	0,2297	0,4778	55,59
$1,46 \times 10^{-5}$	0,1160	0,0181	0,0122	0,1741	0,3623	42,15
$1,46 \times 10^{-4}$	0,0520	0,0281	0,0033	0,0480	0,0999	11,62

TABLA XL.- Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de tomate en función de la concentración de CMU. Los valores son media de cinco repeticiones (\bar{x} : media; c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. molar de CMU	Δ D.O.		Δ (DPIP red) $\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol O}_2$ (mg clorofila) $^{-1}$ min^{-1}	Actividad fotosintética	
	\bar{x}	c.v.			$\mu\text{mol O}_2$ $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$	Valor relativo al testigo %
0	0,3220	0,037	0,0338	0,4835	1,005	100
$1,46 \times 10^{-8}$	0,2750	0,003	0,0289	0,4129	0,859	85,46
$1,46 \times 10^{-7}$	0,2380	0,008	0,02502	0,3573	0,743	73,96
$1,46 \times 10^{-6}$	0,1530	0,015	0,0160	0,2284	0,475	47,28
$1,46 \times 10^{-5}$	0,0760	0,023	0,0080	0,1141	0,237	23,62
$1,46 \times 10^{-4}$	0,0080	0,075	0,00084	0,0120	0,024	2,48

3.3.4. Obtención de las funciones de correlación entre la capacidad fotorreductora de los cloroplastos y la concentración de CMU.

En la tabla XLI se expresan los valores que relacionan la concentración de CMU en la cubeta de reacción y la actividad fotosintética relativa expresada en %.

La correlación existente entre la actividad fotorreductora (A.Fr) de los cloroplastos de cada una de las especies vegetales estudiadas, en función de la concentración de CMU, se expresa en la tabla XLII y se representa en las figuras 23 (cebada), 24 (avena), 25 (trigo), 26 (maíz), 27 (judía) y 28 (tomate).

Para concentraciones de $CMU \geq 10^{-7}$ M (excepto en cebada que es $\geq 10^{-6}$ M), la correlación existente satisface a la ecuación de la recta:

$$H = A + B \log_{10} C$$

mientras que para concentraciones de $CMU \leq 10^{-7}$ M (excepto en cebada que es $\leq 10^{-6}$ M), la correlación existente satisface a la ecuación de la hipérbola:

$$H = \frac{100 \log_{10} C + D}{E + \log_{10} C}$$

en las que:

- H = capacidad fotorreductora
- C = concentración de CMU
- A y B = constantes de la recta
- D y E = constantes de la hipérbola

TABLA XLI.- Relación entre la concentración de CMU en la cubeta de reacción y la actividad fotosintética relativa expresada en %.

Conc. molar de CMU	Actividad fotosintética. Valor relativo al testigo. (%)					
	Cebada	Avena	Trigo	Maíz	Judía	Tomate
0	100	100	100	100	100	100
$1,46 \times 10^{-8}$	90,94	90,82	85,72	91,44	93,31	85,46
$1,46 \times 10^{-7}$	88,73	80,55	81,35	86,20	86,48	73,96
$1,46 \times 10^{-6}$	73,24	58,30	67,46	58,58	55,59	47,28
$1,46 \times 10^{-5}$	45,42	31,80	35,71	36,19	42,15	23,62
$1,46 \times 10^{-4}$	5,98	6,00	6,74	3,80	11,62	2,48

TABLA XIII.-Correlación existente entre la capacidad fotorreductora de los cloroplastos (reacción de Hill) de las diversas especies vegetales y la concentración de CMU.
H = capacidad fotorreductora.
c = concentración de CMU.
r = coeficiente de correlación.

Cloroplastos de:	Para concentración de CMU $\geq 10^{-7}$ M (excepto *)			Para concentración de CMU $\leq 10^{-7}$ M (excepto **)	
	Ecuación $H = A + B \log_{10} c$			Ecuación $H = \frac{100 \log_{10} c + D}{E + \log_{10} c}$	
	A	B	r	D	E
Cebada	-93,89*	-27,61*	98,18*	571,26**	5,65**
Avena	-89,52	-25,14	99,90	596,06	5,77
Trigo	-88,41	-25,56	98,82	290,27	1,98
Maíz	-97,50	-26,95	99,76	615,54	6,05
Judía	-77,90	-23,80	98,96	617,90	6,06
Tomate	-90,07	-23,81	99,86	601,97	5,71

* para valores $\geq 10^{-6}$
** para valores $\leq 10^{-6}$

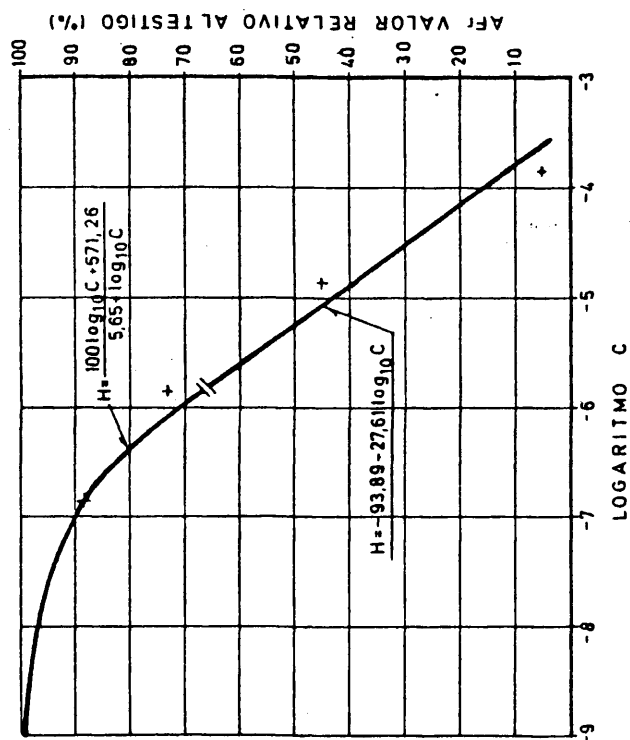


FIG. 23
ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFr) DE LOS CLOROPLASTOS DE CEBADA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS EN % A LA AFR DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU.



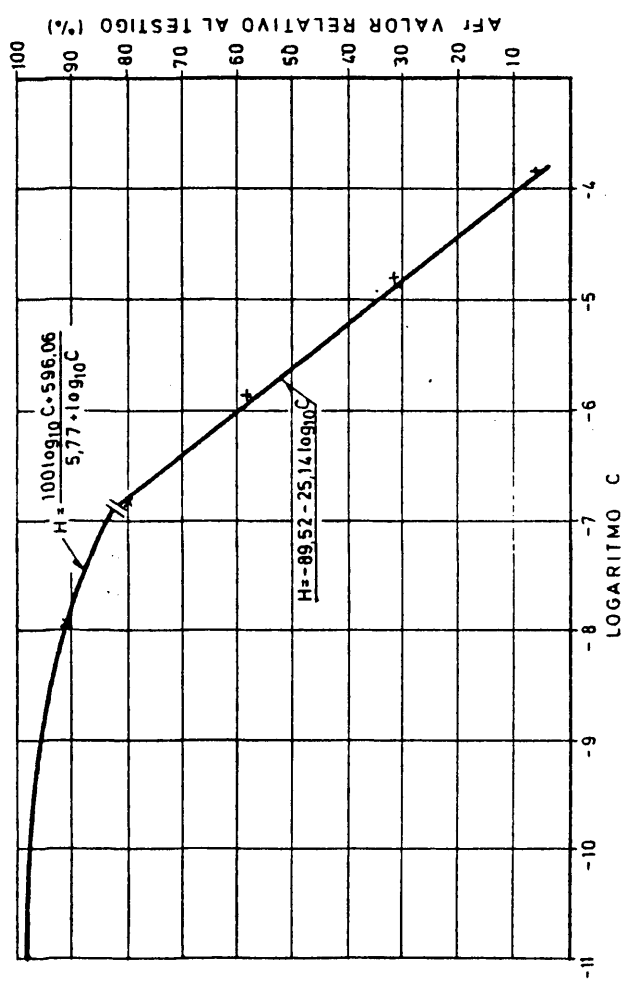


FIG. 24
ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFr) DE LOS CLOROPLASTOS DE AVENA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS EN % A LA AFR DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU.

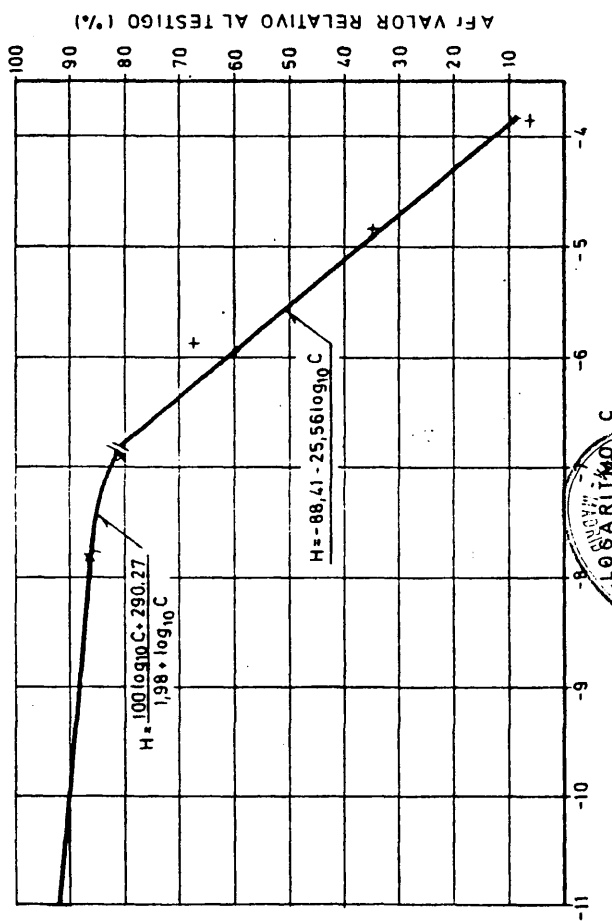
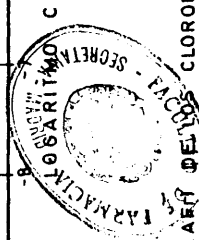


FIG. 25
ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFR) DE LOS CLOROPLASTOS DE TRIGO EN FUNCION
DE LA CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS
EN %, A LA AFR DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU.



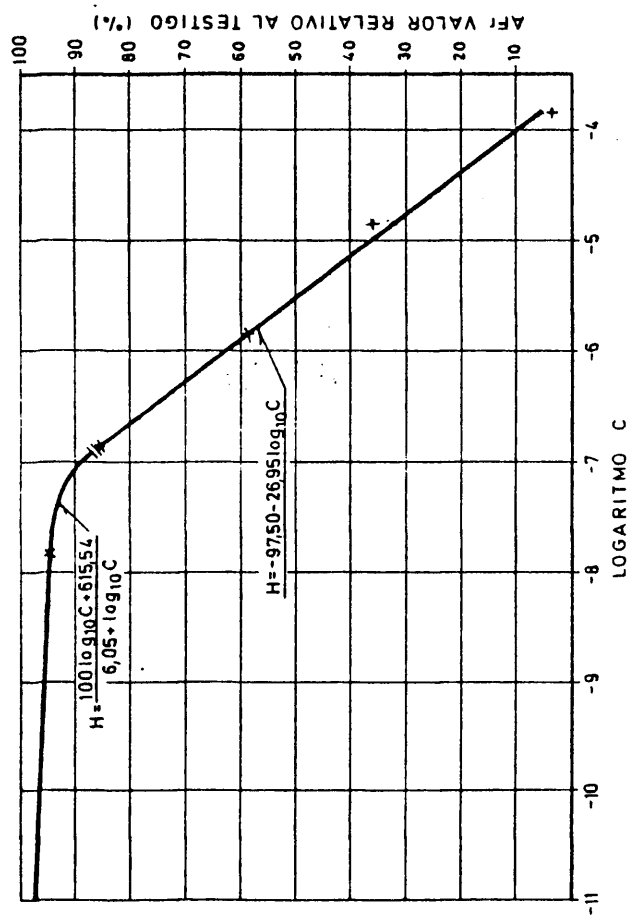


FIG. 26
ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFR) DE LOS CLOROPLASTOS DE MAIZ EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS EN % A LA
AFR DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU.

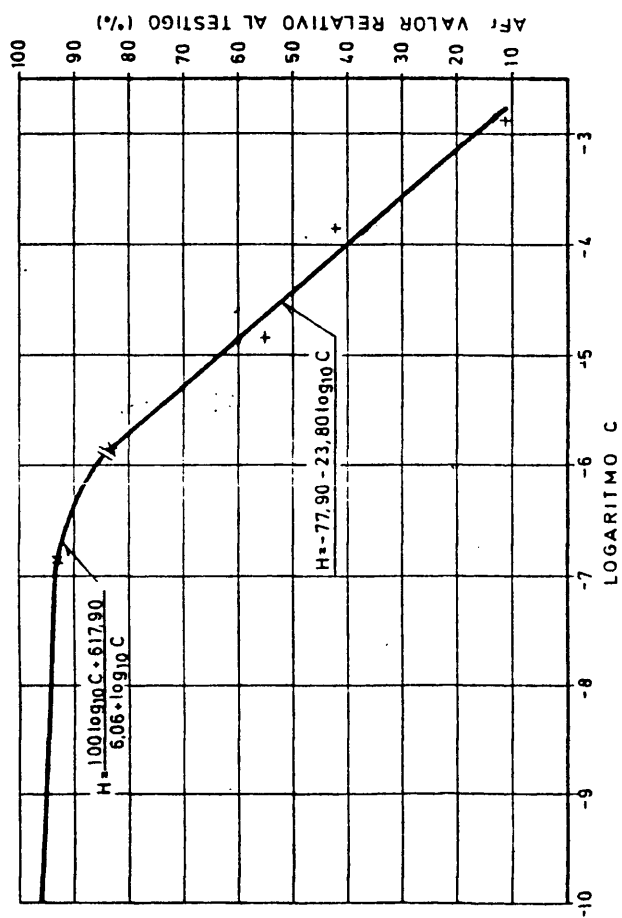


FIG. 27
ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFr) DE LOS CLOROPLASTOS DE JUDIA EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS EN % A LA
AFr DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU

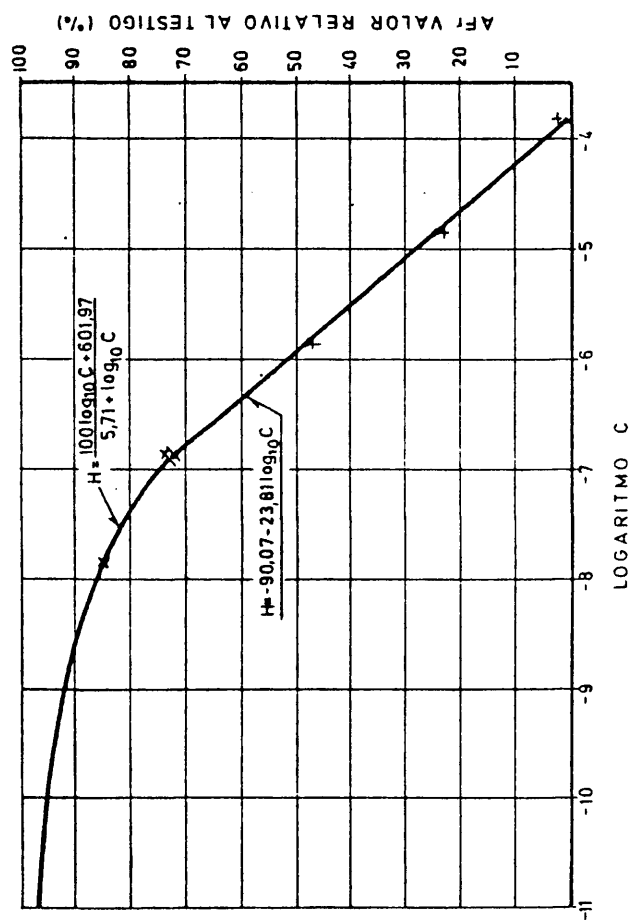


FIG. 28
 ACTIVIDAD FOTOREDUCTORA (AFR) DE LOS CLOROPLASTOS DE TOMATE EN FUNCION
 DE LA CONCENTRACION DE CMU. LOS VALORES DE LA AFR ESTAN REFERIDOS EN
 % A LA AFR DE LOS CLOROPLASTOS SIN CMU.

3.4. EFFECTO DEL CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA.

En la tabla XLIII se indica el efecto de diversas concentraciones de CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella Pyrenoidosa.

Los valores expresan μ moles de oxígeno desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones. Los valores de actividad fotosintética se representan, en forma semilogarítmica, en la figura 29 y satisfacen a la siguiente ecuación de la recta:

$$AF = A + B \log_{10} C$$

en la que:

AF = actividad fotosintética.

C = concentración de CMU.

AyB= constantes de la recta.

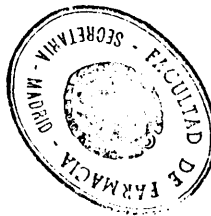


TABLA XLIII.- Efecto del CMU sobre la actividad fotosintética y respiración del alga *Chlorella*. Los valores (\bar{X}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,3746	0,449	100	0,3308	0,090	100
10^{-10}	0,350	0,060	95,22	0,3308	0,240	100
10^{-9}	0,275	0,272	75,02	0,3124	0,204	94,43
10^{-8}	0,233	0,174	63,48	0,294	0,233	88,87
10^{-7}	0,123	0,443	33,64	0,275	0,172	83,31
10^{-6}	0,067	0,547	18,27	0,248	0,273	74,97
10^{-5}	0,035	0,068	9,12	0,211	0,321	63,84
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	55,50

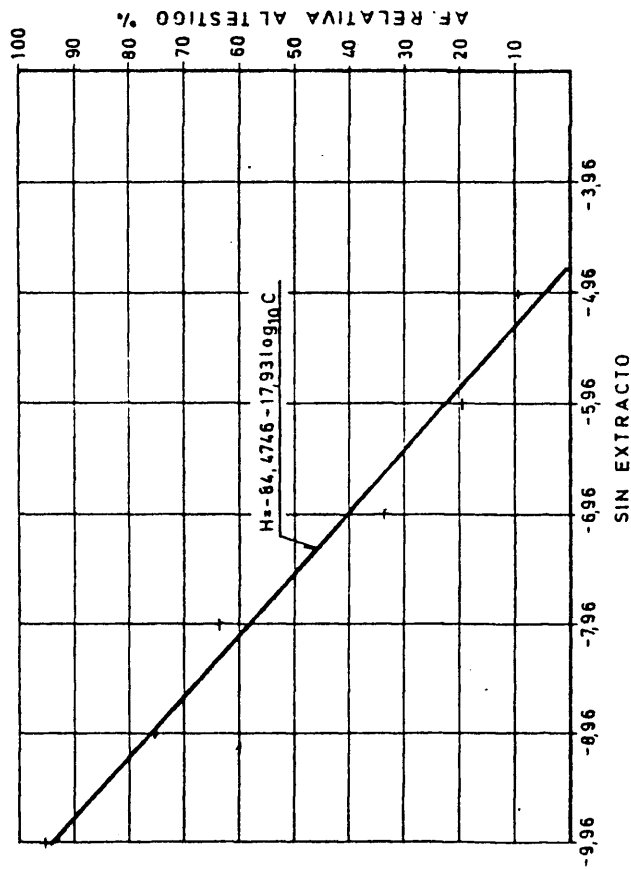


FIG. 29
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE CMU

3.5. EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYRENOIDOSA.

3.5.1. Curvas de calibrado.

La evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de las diferentes especies vegetales estudiadas, se realizó a partir de sendas curvas de calibrado en las que se relacionaba la concentración de CMU y el grado de inhibición de la actividad fotosintética en cultivos de Chlorella Pyrenoidosa que contenían extractos de hoja de las diferentes especies.

Los valores obtenidos, expresados en μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila, son media de cuatro repeticiones y se expresan en las tablas XLIV (cebada), XLV (avena), XLVI (trigo), XLVII (maíz), XLVIII (judía) y XLIX (tomate).

TABLA XLIV.- Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extrac-
to de hojas de cebada, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad
fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Los valores (\bar{X}) repre-
santan los μ moles de O₂ desprendidos o consumidos por minuto y miligramo
de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de
variabilidad).

Conc.de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,294	0,233	100	0,367	0,216	100
10^{-10}	0,284	0,220	96,73	0,367	0,182	100
10^{-9}	0,274	0,196	93,37	0,350	0,060	95,26
10^{-8}	0,234	0,259	80,03	0,330	0,240	90,00
10^{-7}	0,119	0,568	40,01	0,312	0,204	85,00
10^{-6}	0,068	0,456	23,32	0,275	0,172	75,01
10^{-5}	0,045	0,400	15,5	0,229	0,295	62,50
10^{-4}	-	-	-	0,193	0,182	52,50

TABLA XLV.- Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extrac-
to de hojas de avena, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fo-
tosintética y respiratoria del alga Chlorella. Los valores (\bar{x}) expresan
los μ moles de O₂ desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clo-
rofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabi-
lidad).

Conc. de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética μ mol O ₂ ·min ⁻¹ (mg clorofila) ⁻¹			Respiración μ mol O ₂ ·min ⁻¹ (mg clorofila) ⁻¹		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10 ⁻¹⁰	0,326	0,054	98,72	0,331	0,240	100
10 ⁻⁹	0,308	0,057	93,39	0,331	0,073	97,22
10 ⁻⁸	0,286	0,220	86,72	0,294	0,233	88,88
10 ⁻⁷	0,220	0,347	66,70	0,278	0,272	83,33
10 ⁻⁶	0,138	0,335	41,83	0,257	0,209	79,77
10 ⁻⁵	0,066	0,456	20,01	0,248	0,273	75,00
10 ⁻⁴	-	-	-	0,239	0,295	62,50

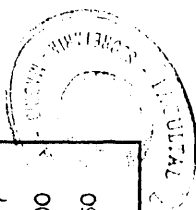


TABLA XLVII.- Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extrac-
to de hojas de maíz, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fo-
tosintética y respiratoria del alga Chlorella. Los valores (\bar{X}) expresan
los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clo-
rofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabi-
lidad).

Conc. de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,286	0,220	100	0,312	0,204	100
10^{-10}	0,275	0,203	96,40	0,312	0,204	100
10^{-9}	0,256	0,200	89,30	0,294	0,233	94,11
10^{-8}	0,237	0,249	82,15	0,279	0,205	89,64
10^{-7}	0,205	0,365	71,44	0,266	0,164	85,29
10^{-6}	0,145	0,204	50,00	0,248	0,273	79,41
10^{-5}	0,060	0,543	21,43	0,229	0,295	73,53
10^{-4}	-	-	-	0,206	0,365	65,88



TABLA XLVIII.- Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extrac-
to de hojas de judía, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad
fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Los valores (\bar{x}) expre-
san los $\mu\text{moles de O}_2$ desprendidos o consumidos por minuto y miligramo
de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de
variabilidad).

Conc. de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg clorofila})^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg clorofila})^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,350	0,449	100	0,339	0,184	100
10^{-10}	0,347	0,155	99,47	0,339	0,184	100
10^{-9}	0,340	0,184	97,48	0,330	0,240	97,34
10^{-8}	0,304	0,162	87,43	0,321	0,073	94,69
10^{-7}	0,221	0,346	63,87	0,303	0,160	89,38
10^{-6}	0,164	0,285	47,53	0,287	0,223	84,66
10^{-5}	0,045	0,400	12,77	0,266	0,164	78,46
10^{-4}	0,011	0,043	3,76	0,239	0,251	70,50

TABLA XLIX.- Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extrac-
to de hojas de tomate, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad
fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Los valores (\bar{x}) repre-
santan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo
de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de
variabilidad).

Conc.de CMU en la suspensión (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,312	0,204	100	0,294	0,233	100
10^{-10}	0,249	0,274	79,99	0,294	0,233	100
10^{-9}	0,221	0,349	72,00	0,284	0,220	96,59
10^{-8}	0,215	0,321	68,00	0,275	0,172	93,53
10^{-7}	0,185	0,260	60,00	0,266	0,164	90,47
10^{-6}	0,112	0,509	36,00	0,257	0,202	87,41
10^{-5}	0,063	0,450	20,00	0,239	0,251	81,29
10^{-4}	0,025	0,472	8,00	0,220	0,347	74,82

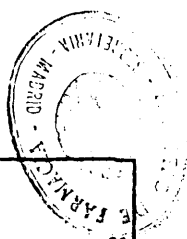
TABLA L.- Correlación existente entre la capacidad fotosintética de Chlorella Pyrenoidosa y la concentración de CMU, en extractos de hojas de las diversas especies vegetales.

AF = actividad fotosintética

C = concentración de CMU

r = coeficiente de correlación

Extracto de:	Para concentraciones de CMU $\geq 10^{-7},96$			Para concentraciones de CMU $\leq 10^{-7},96$		
	Ecuación AF = $A + B \log_{10} c$			Ecuación AF = $\frac{100 \log_{10} c + D}{E + \log_{10} c}$		
	A	B	r	D	E	
Cebada	-97,42	-21,24	97,13	815,85	8,09	
Avena	-91,53	-22,50	99,92	696,19	6,82	
Trigo	-126,00	-26,27	98,46	746,95	7,37	
Maiz	-75,27	-20,36	98,11	425,41	3,69	
Judía	-86,79	-21,76	98,91	776,12	7,73	
Tomate	-56,96	-16,00	99,01	496,76	3,71	
Sin extracto	-84,47	-17,93	99,07	--	--	



3.5.2. Obtención de las funciones de correlación entre la actividad fotosintética y la concentración de CMU.

La correlación existente entre la capacidad fotosintética de *Chlorella Pyrenoidosa* y la concentración de CMU en extractos de hojas de las diversas especies vegetales, se puede ajustar a una recta de ecuación:

$$AF = A + B \log_{10} C$$

para concentraciones de CMU $\geq 10^{-7,96}$ M

y a una hipérbola de ecuación:

$$AF = \frac{100 \log_{10} C + D}{E + \log_{10} C}$$

para concentraciones de CMU $\leq 10^{-7,96}$ M

en las que:

AF = actividad fotosintética

C = concentración de CMU

A y B = constantes de la recta

D y E = constantes de la hipérbola

Los coeficientes de las correspondientes curvas de regresión para los extractos de las diversas plantas estudiadas, se expresan en la tabla L y se representan gráficamente en las figuras 30 (cebada), 31 (avena), 32 (trigo), 33 (maíz), 34 (judía) y 35 (tomate).

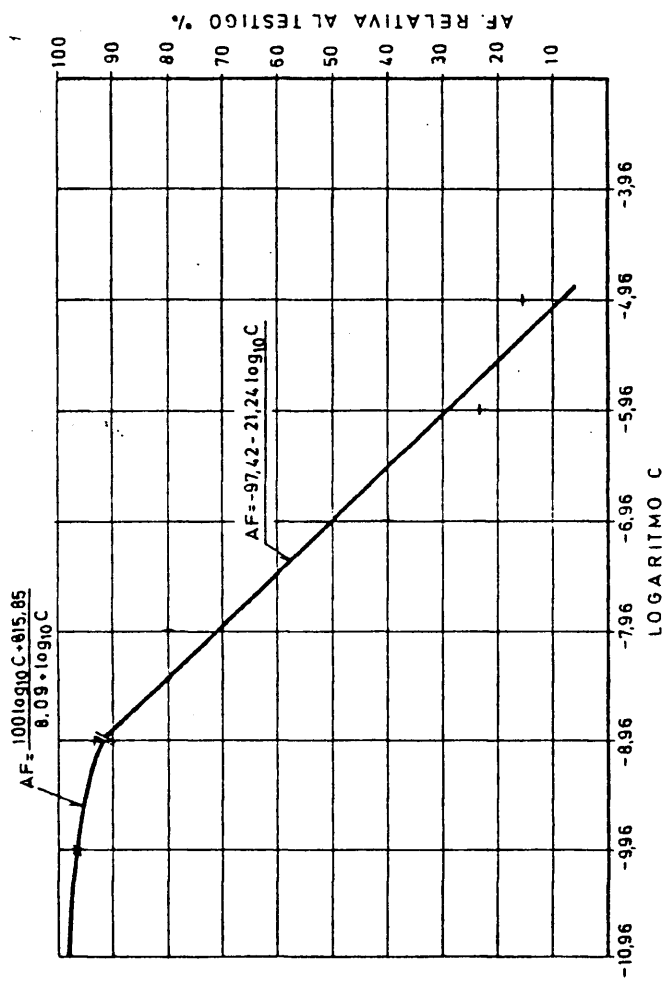


FIG. 30
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE CMU EN EXTRATOS DE HOJAS DE CEBADA

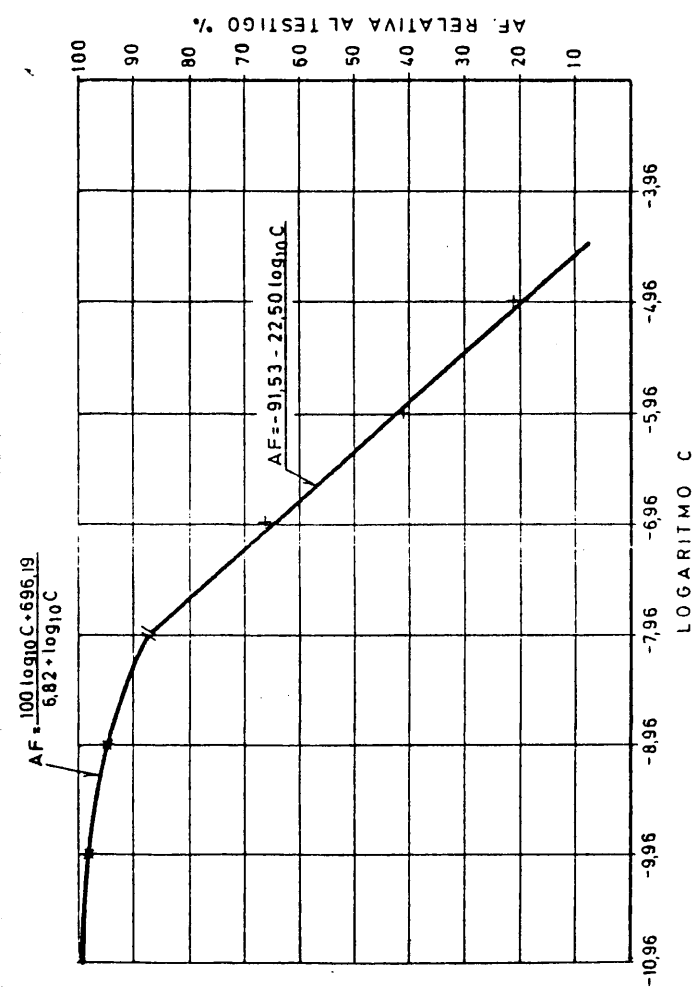


FIG. 31
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CMU EN EXTRACTOS DE HOJAS DE AVENA

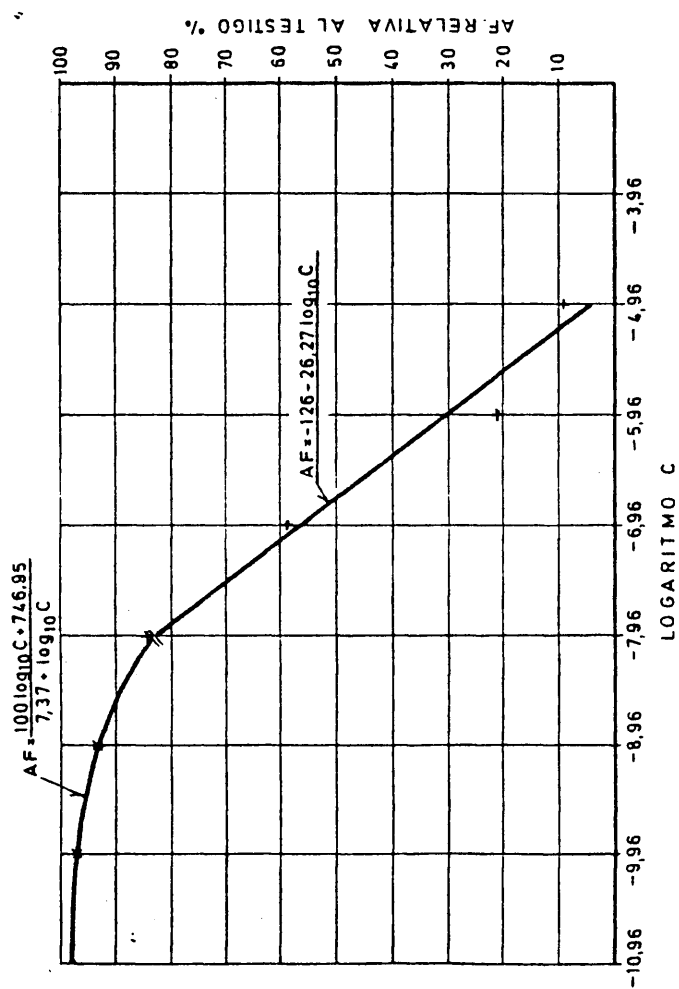


FIG. 32
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE CMU EN EXTRACTOS DE HOJAS DE TRIGO

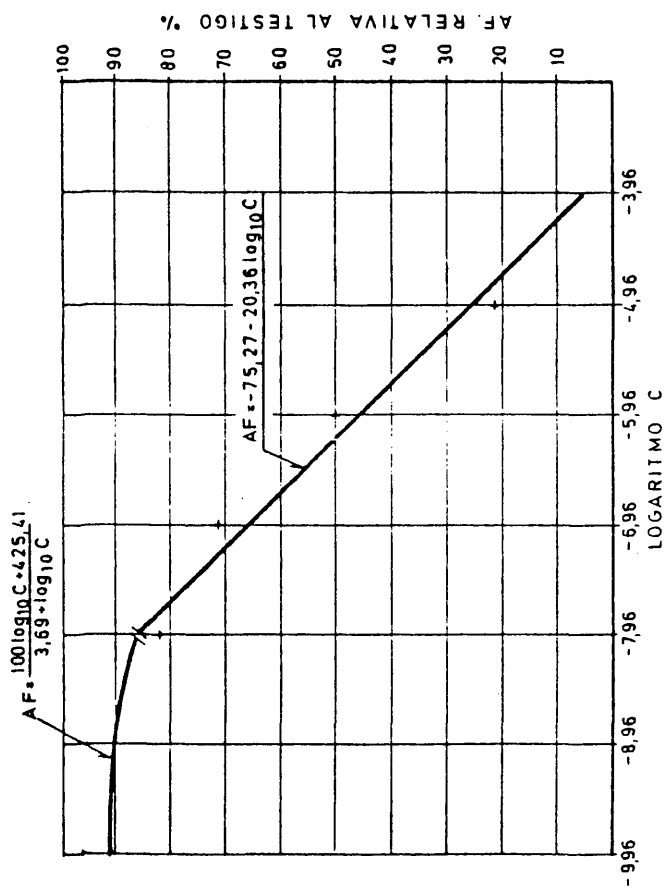
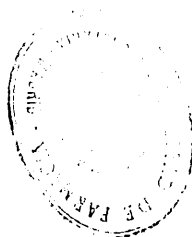


FIG. 33
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA
CONCENTRACION DE CMU EN EXTRACTOS DE HOJAS DE MAIZ

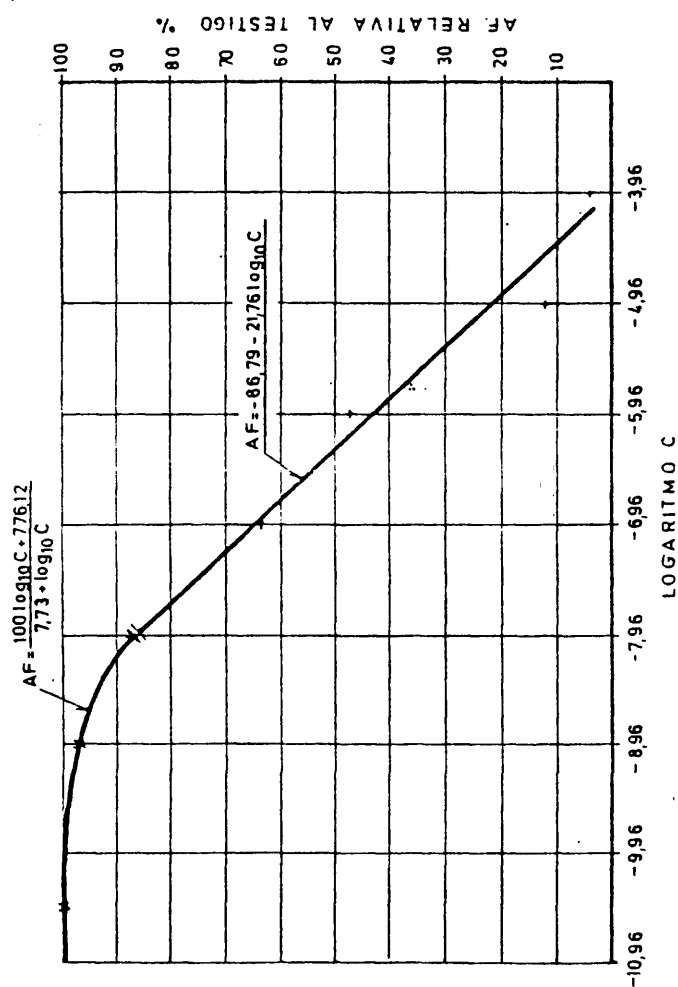


FIG. 34
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE CMU EN EXTRACTOS DE HOJAS DE JUDIA

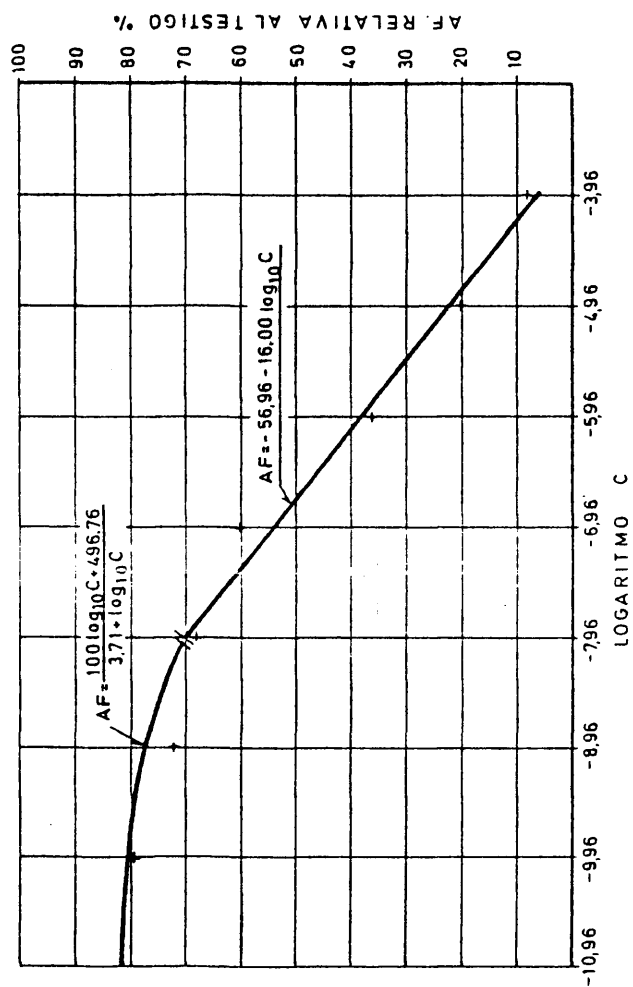


FIG.35
ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DE CHLORELLA PYR. EN FUNCION DE LA CONCENTRACION
DE CMU EN EXTRACTOS DE HOJAS DE TOMATE

3.5.3. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 24 horas.

El efecto del extracto de las hojas de las distintas especies vegetales que absorbieron radicalmente diferentes concentraciones de CMU durante 24 horas, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*, se indica en las tablas LI (cebada), LII (avena), LIII (trigo), LIV (maíz), LV (judía) y LVI (tomate).

Los valores expresan μ moles de oxígeno desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones.

3.5.4. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 7 días.

El efecto del extracto de las hojas de las distintas especies vegetales que absorbieron radicalmente diferentes concentraciones de CMU durante 7 días sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*, se indican en las tablas LVII (cebada), LVIII (avena), LIX (trigo), LX (maíz), LXI (judía) y LXII (tomate).

Al igual que en el punto anterior, los valores expresan μ moles de oxígeno desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones.

TABLA LI.- Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los $\mu\text{moles de O}_2$ desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg clorofila})^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg clorofila})^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,294	0,233	100	0,367	0,216	100
10^{-10}	0,284	0,220	96,72	0,350	0,060	95
10^{-9}	0,274	0,196	93,39	0,330	0,240	90
10^{-8}	0,243	0,216	83,38	0,294	0,233	80
10^{-7}	0,166	0,286	56,70	0,266	0,164	72,5
10^{-6}	0,098	0,239	33,35	0,238	0,251	65
10^{-5}	0,036	0,816	13,34	0,220	0,347	60
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	50

TABLA LII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{X}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,330	0,240	100
10^{-10}	0,327	0,054	97,91	0,330	0,240	100
10^{-9}	0,312	0,160	91,74	0,312	0,204	94,4
10^{-8}	0,285	0,220	85,57	0,303	0,160	91,6
10^{-7}	0,220	0,347	66,06	0,266	0,164	80,5
10^{-6}	0,138	0,335	41,38	0,248	0,273	75,0
10^{-5}	0,056	0,577	17,15	0,239	0,251	72,2
10^{-4}	-	-	-	0,220	0,347	66,6



TABLA LIII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{X}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c. v.	%	\bar{x}_R	c. v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10^{-10}	0,321	0,073	97,78	0,321	0,073	97,22
10^{-9}	0,312	0,204	94,55	0,312	0,204	94,55
10^{-8}	0,281	0,223	85,11	0,294	0,233	88,88
10^{-7}	0,205	0,365	63,01	0,275	0,272	83,33
10^{-6}	0,073	0,707	22,19	0,257	0,202	77,77
10^{-5}	0,031	0,165	9,52	0,239	0,251	72,22
10^{-4}	-	-	-	0,220	0,347	66,66

TABLA LIV.- Efecto del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,286	0,220	100	0,312	0,204	100
10^{-10}	0,279	0,205	98,23	0,312	0,204	100
10^{-9}	0,275	0,203	96,59	0,294	0,233	94,23
10^{-8}	0,256	0,200	89,30	0,269	0,194	86,21
10^{-7}	0,234	0,259	81,05	0,254	0,199	81,41
10^{-6}	0,177	0,387	61,90	0,222	0,348	71,15
10^{-5}	0,123	0,443	42,86	0,198	0,352	63,46
10^{-4}	0,049	0,406	17,86	0,174	0,201	55,95

TABLA LV.- Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,350	0,449	100	0,339	0,184	100
10^{-10}	0,342	0,153	98,95	0,339	0,184	100
10^{-9}	0,338	0,182	97,06	0,330	0,240	97,30
10^{-8}	0,295	0,235	84,81	0,312	0,204	92,03
10^{-7}	0,219	0,342	62,09	0,294	0,233	86,72
10^{-6}	0,149	0,212	41,98	0,266	0,164	78,46
10^{-5}	0,061	0,082	19,80	0,239	0,251	70,50
10^{-4}	-	-	-	0,211	0,321	62,24

TABLA LVI.- Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 24 h en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (x) expresan μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,312	0,204	100	0,294	0,233	100
10^{-10}	0,239	0,251	77,27	0,284	0,220	96,59
10^{-9}	0,216	0,323	68,67	0,271	0,196	92,17
10^{-8}	0,201	0,357	63,88	0,266	0,164	90,47
10^{-7}	0,167	0,284	53,70	0,257	0,202	87,41
10^{-6}	0,092	0,326	29,49	0,239	0,251	81,29
10^{-5}	0,034	0,542	11,10	0,220	0,347	74,82
10^{-4}	0,012	0,475	4,40	0,205	0,364	69,72

TABLA LVII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,294	0,233	100	0,367	0,216	100
10^{-10}	0,278	0,203	94,73	0,330	0,240	90
10^{-9}	0,266	0,164	91,83	0,303	0,160	82,5
10^{-8}	0,215	0,321	73,37	0,294	0,197	80
10^{-7}	0,147	0,204	50,03	0,266	0,164	72,5
10^{-6}	0,086	0,360	29,42	0,238	0,251	65
10^{-5}	-	-	-	0,220	0,347	60
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	50

TABLA LVIII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radiación CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coef. de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10^{-10}	0,312	0,204	95,28	0,331	0,090	100
10^{-9}	0,295	0,230	90,74	0,321	0,073	97,22
10^{-8}	0,248	0,274	75,40	0,294	0,233	88,88
10^{-7}	0,166	0,283	49,27	0,257	0,202	77,77
10^{-6}	0,071	0,408	19,90	0,239	0,251	72,22
10^{-5}	-	-	-	0,220	0,347	66,66
10^{-4}	-	-	-	0,215	0,321	64,44

TABLA LIX.- Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10^{-10}	0,319	0,073	95,83	0,331	0,240	97,22
10^{-9}	0,278	0,203	84,09	0,294	0,233	88,88
10^{-8}	0,256	0,200	77,38	0,275	0,272	83,33
10^{-7}	0,177	0,387	53,65	0,248	0,273	75,00
10^{-6}	0,060	0,384	18,30	0,229	0,295	69,44
10^{-5}	-	-	-	0,205	0,364	61,11
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	55,50

TABLA LX.- Efecto del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{X}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son mg día de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética $\mu mol O_2 \cdot min^{-1} (mg \text{ clorofila})^{-1}$			Respiración $\mu mol O_2 \cdot min^{-1} (mg \text{ clorofila})^{-1}$		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,286	0,220	100	0,312	0,204	100
10^{-10}	0,275	0,272	97,08	0,312	0,204	100
10^{-9}	0,265	0,163	92,90	0,285	0,221	91,34
10^{-8}	0,249	0,273	86,97	0,259	0,204	83,01
10^{-7}	0,190	0,180	66,47	0,239	0,251	76,60
10^{-6}	0,125	0,444	43,46	0,219	0,342	70,19
10^{-5}	0,037	0,073	13,02	0,205	0,362	65,70
10^{-4}	-	-	-	0,174	0,201	55,77

TABLA LXI.- Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*. Las plantas estuvieron durante 1 semana en sol. nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	$\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$	c.v.	%	\bar{x}_R	$\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{ (mg clorofila)}^{-1}$
0	0,350	0,449	0,449	100	0,339	0,184
10^{-10}	0,340	0,186	0,186	97,59	0,330	0,240
10^{-9}	0,328	0,239	0,239	94,03	0,312	0,204
10^{-8}	0,277	0,175	0,175	80,00	0,294	0,233
10^{-7}	0,193	0,182	0,182	54,97	0,266	0,164
10^{-6}	0,123	0,443	0,443	35,49	0,233	0,174
10^{-5}	0,045	0,816	0,816	12,19	0,185	0,263
10^{-4}	-	-	-	-	0,166	0,283

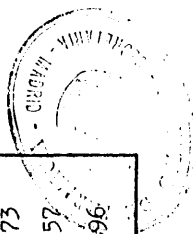


TABLA LXII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU. Los valores (\bar{x}) expresan los μmoles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,312	0,204	100	0,294	0,233	100
10^{-10}	0,237	0,249	75,27	0,275	0,172	93,53
10^{-9}	0,206	0,365	65,57	0,266	0,164	90,47
10^{-8}	0,177	0,387	57,08	0,257	0,202	87,50
10^{-7}	0,157	0,225	49,89	0,239	0,251	81,25
10^{-6}	0,049	0,406	16,44	0,220	0,347	75,00
10^{-5}	0,025	0,471	7,95	0,193	0,182	65,62
10^{-4}	-	-	-	0,167	0,284	56,25

3.5.5. Efecto de los extractos de hojas de plantas tratadas durante 7 días con diferentes concentraciones de CMU y mantenidas la semana siguiente en solución nutritiva (sin CMU).

El efecto del extracto de las hojas de las distintas especies vegetales que absorbieron radicalmente diferentes concentraciones de CMU durante 7 días y se mantuvieron la semana siguiente en solución nutritiva (sin CMU), sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*, se expresa en las tablas LXIII (cebada), LXIV (avena), LXV (trigo), LXVI (maíz), LXVII (judía) y LXVIII (tomate).

Como ya se indicó anteriormente, los valores expresan μ moles de oxígeno desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones.

TABLA LXIII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,294	0,233	100	0,367	0,216	100
10^{-10}	0,280	0,203	95,55	0,350	0,060	95
10^{-9}	0,271	0,196	92,37	0,330	0,240	90
10^{-8}	0,239	0,251	81,48	0,312	0,204	85
10^{-7}	0,157	0,225	53,63	0,284	0,220	77,5
10^{-6}	0,091	0,326	31,13	0,238	0,251	65
10^{-5}	-	-	-	0,220	0,347	60
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	50

TABLA LXIV.- Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10^{-10}	0,319	0,073	96,46	0,331	0,240	100
10^{-9}	0,301	0,160	91,01	0,321	0,073	97,22
10^{-8}	0,262	0,163	79,31	0,303	0,160	91,66
10^{-7}	0,186	0,258	56,35	0,278	0,203	83,33
10^{-6}	0,066	0,408	20,07	0,238	0,251	72,22
10^{-5}	-	-	-	0,220	0,347	66,66
10^{-4}	-	-	-	0,206	0,365	62,22

TABLA LXV.- Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{X}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{X}_F	c.v.	%	\bar{X}_R	c.v.	%
0	0,331	0,240	100	0,331	0,240	100
10^{-10}	0,319	0,073	96,42	0,331	0,240	100
10^{-9}	0,310	0,060	93,87	0,321	0,173	97,77
10^{-8}	0,271	0,196	82,14	0,294	0,233	88,88
10^{-7}	0,193	0,182	58,64	0,257	0,202	77,77
10^{-6}	0,068	0,381	18,84	0,229	0,295	69,44
10^{-5}	-	-	-	0,205	0,364	61,11
10^{-4}	-	-	-	0,183	0,258	55,5

TABLAS LXVI.- Efectos del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicularmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella*. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	$\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$	c.v.	%	\bar{x}_R	$\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$
0	0,286	0,220	100		0,312	0,204
10^{-10}	0,276	0,274	97,18		0,312	0,204
10^{-9}	0,274	0,270	95,91		0,294	0,233
10^{-8}	0,253	0,202	88,63		0,275	0,272
10^{-7}	0,195	0,186	67,83		0,257	0,202
10^{-6}	0,123	0,432	42,85		0,233	0,174
10^{-5}	0,035	0,069	12,79		0,220	0,347
10^{-4}	-	-	-		0,157	0,225
						50,00

TABLA LXVII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc.de CMU en la sol.nutritiva (M)	Actividad fotosintética			Respiración		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,350	0,449	100	0,339	0,184	100
10^{-10}	0,344	0,189	98,53	0,330	0,240	97,34
10^{-9}	0,329	0,240	94,55	0,321	0,073	94,69
10^{-8}	0,288	0,229	83,03	0,303	0,160	89,38
10^{-7}	0,203	0,359	57,38	0,278	0,203	82,00
10^{-6}	0,120	0,440	34,34	0,230	0,297	67,84
10^{-5}	0,045	0,816	12,30	0,183	0,258	54,98
10^{-4}	-	-	-	0,166	0,283	48,96



TABLA LXVIII.- Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicalmente CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella. Las plantas estuvieron durante 1 semana en solución nutritiva con diferentes concentraciones de CMU y la semana posterior en solución nutritiva sola. Los valores (\bar{x}) expresan los μ moles de O_2 desprendidos o consumidos por minuto y miligramo de clorofila y son media de cuatro repeticiones (c.v.: coeficiente de variabilidad).

Conc. de CMU en la sol. nutritiva (M)	Actividad fotosintética μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$			Respiración μ mol $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ (mg clorofila) $^{-1}$		
	\bar{x}_F	c.v.	%	\bar{x}_R	c.v.	%
0	0,312	0,204	100	0,294	0,233	100
10^{-10}	0,237	0,249	76,25	0,294	0,233	100
10^{-9}	0,210	0,371	66,77	0,275	0,172	93,53
10^{-8}	0,183	0,258	59,69	0,266	0,164	90,47
10^{-7}	0,163	0,280	51,30	0,257	0,202	87,41
10^{-6}	0,052	0,410	17,30	0,236	0,249	80,27
10^{-5}	0,022	0,389	7,40	0,185	0,260	62,92
10^{-4}	-	-	-	0,164	0,281	55,73

3.5.6. Estimación de la concentración de CMU en las hojas de plantas tratadas.

A partir de las ecuaciones de regresión obtenidas para cada especie vegetal, se calculó la concentración estimada de CMU en las hojas de las plantas tratadas.

Para ello se utilizaron los valores de la actividad fotosintética de cultivos de *Chlorella* colocados en un medio con extracto de las hojas de las plantas tratadas durante 24 horas y una semana.

Estos valores se expresan en las tablas LXIX (cebada), LXX (avena), LXXI (trigo), LXXII (maíz), - LXXIII (judía) y LXXIV (tomate).

TABLA LXIX.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de cebada después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

Para $C \geq 10^{-7},96 \text{ M}$ $AF = -97,42 - 21,24 \log_{10} 0$

Para $C \leq 10^{-7},96 \text{ M}$ $AF = \frac{100 \log_{10} C + 815,85}{8,09 + \log_{10} C}$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LI (24 h), LVII (1 semana) y LXII (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo).

Conc.de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:		veces en la solución			
	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana
10^{-10}	$4,25 \times 10^{-9}$	$1,35 \times 10^{-8}$	$7,78 \times 10^{-9}$	42,50	135	77,80
10^{-9}	$2,49 \times 10^{-8}$	$3,92 \times 10^{-8}$	$3,43 \times 10^{-8}$	24,90	39,2	34,30
10^{-8}	$1,023 \times 10^{-7}$	$3,02 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-7}$	10,23	30,2	12,50
10^{-7}	$8,88 \times 10^{-7}$	$2,79 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-6}$	8,88	27,9	15,70
10^{-6}	$7,02 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	7,02	25,0	13,50
10^{-5}	$6,15 \times 10^{-5}$	-	-	6,15	-	-

TABLA LXX.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de avena después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

Para $C \geq 10^{-7},96 M$ $AF = -91,53 - 22,50 \log_{10} C$

Para $C \leq 10^{-7},96 M$ $AF = \frac{100 \log_{10} C + 696,19}{6,82 + \log_{10} C}$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LII (24 h), LVIII (1 semana) y LXIV (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo)

Conc. de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:			veces en la solución		
	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana
10^{-10}	-	$9,95 \times 10^{-9}$	$7,49 \times 10^{-9}$	-	99,50	74,90
10^{-9}	$4,63 \times 10^{-8}$	$8,49 \times 10^{-7}$	$6,73 \times 10^{-8}$	46,30	84,90	67,30
10^{-8}	$4,45 \times 10^{-7}$	$6,26 \times 10^{-7}$	$5,48 \times 10^{-7}$	44,50	62,60	54,80
10^{-7}	$3,26 \times 10^{-6}$	$5,57 \times 10^{-6}$	$4,69 \times 10^{-6}$	32,90	55,70	46,90
10^{-6}	$2,68 \times 10^{-5}$	$3,69 \times 10^{-5}$	$3,63 \times 10^{-5}$	26,80	36,90	36,30
10^{-5}	$1,88 \times 10^{-4}$	-	-	18,80	-	-

TABLA LXXI.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de trigo después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para } C \geq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = -126 - 26,27 \log_{10} C$$

$$\text{Para } C \leq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = \frac{100 \log_{10} C + 746,95}{7,37 + \log_{10} C}$$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LIII (24 h), LIX (1 semana) y LXV (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo).

Conc. de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:		veces en la solución			
	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana
10^{-10}	$8,94 \times 10^{-9}$	$1,80 \times 10^{-8}$	$1,36 \times 10^{-8}$	89,40	180	136
10^{-9}	$8,59 \times 10^{-8}$	$1,36 \times 10^{-7}$	$9,36 \times 10^{-8}$	85,90	136	93,60
10^{-8}	$6,26 \times 10^{-7}$	$9,00 \times 10^{-7}$	$7,96 \times 10^{-7}$	62,60	90	79,60
10^{-7}	$5,29 \times 10^{-6}$	$7,81 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-6}$	52,90	78,10	61,10
10^{-6}	$4,82 \times 10^{-5}$	$5,06 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-4}$	48,20	50,60	50,10
10^{-5}	$2,35 \times 10^{-4}$	-	-	23,50	-	-

TABLA LXXII.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de maíz después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para } C \geq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = -75,27 - 20,36 \log_{10} C$$

$$\text{Para } C \leq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = \frac{100 \log_{10} C + 425,41}{3,69 + \log_{10} C}$$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LIV (24 h), LX (1 semana) y LXVI (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo).

Conc.de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:			veces en la solución		
	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana
10^{-10}	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	$1,20 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{-7}$	$1,30 \times 10^{-7}$	120	182	130
10^{-8}	$2,75 \times 10^{-7}$	$3,56 \times 10^{-7}$	$2,96 \times 10^{-7}$	27,50	35,60	29,60
10^{-7}	$6,96 \times 10^{-7}$	$2,63 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-6}$	6,96	26,30	21,10
10^{-6}	$6,66 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$	6,66	14,80	12,30
10^{-5}	$5,21 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$	5,21	13,30	12,70
10^{-4}	$1,84 \times 10^{-4}$	-	-	1,84	-	-

TABLA LXXIII.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de judía después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para } C \geq 10^{-7,96} \text{ M} \quad AF = -86,79 - 31,76 \log_{10} C$$

$$\text{Para } C \leq 10^{-7,96} \text{ M} \quad AF = \frac{100 \log_{10} C + 776,12}{7,73 + \log_{10} C}$$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LV (24 h), LXI (1 semana) y LXVII (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo).

Conc. de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:			veces en la solución		
	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana	24 h	1 semana	1 semana + 1 semana
10^{-10}	$6,56 \times 10^{-9}$	$1,34 \times 10^{-8}$	$9,65 \times 10^{-9}$	65,60	134	96,50
10^{-9}	$5,34 \times 10^{-8}$	$1,26 \times 10^{-7}$	$9,66 \times 10^{-8}$	53,40	126	96,60
10^{-8}	$4,32 \times 10^{-7}$	$9,19 \times 10^{-7}$	$5,21 \times 10^{-7}$	43,20	91,90	52,10
10^{-7}	$4,15 \times 10^{-6}$	$9,01 \times 10^{-6}$	$4,85 \times 10^{-6}$	41,50	90,10	48,50
10^{-6}	$3,99 \times 10^{-5}$	$7,98 \times 10^{-5}$	$4,01 \times 10^{-5}$	39,90	79,80	40,10
10^{-5}	$1,19 \times 10^{-4}$	$3,37 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-4}$	11,90	33,70	22,70
10^{-4}	-	-	-	-	-	-

TABLA LXXIV.- Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de tomate después de diferente tiempo de absorción radicular. Los valores están obtenidos a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para } C \geq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = -56,96 - 16 \log_{10} C$$

$$\text{Para } C \leq 10^{-7},96 \text{ M} \quad AF = \frac{100 \log_{10} C + 496,76}{3,71 + \log_{10} C}$$

Teniendo en cuenta los resultados de AF de las Tablas LVI (24 h), LXII (1 semana) y LXVIII (1 semana en solución de CMU y la semana siguiente en solución nutritiva sólo).

Conc.de CMU en la solución (M)	Concentración en la hoja después de:				veces en la solución			
	24 h	1 semana	1 semana +	1 semana	24 h	1 semana	1 semana +	1 semana
10^{-10}	$1,90 \times 10^{-8}$	$5,31 \times 10^{-8}$	$3,26 \times 10^{-8}$	$3,26 \times 10^{-8}$	190	531	326	326
10^{-9}	$1,65 \times 10^{-7}$	$4,29 \times 10^{-7}$	$3,10 \times 10^{-7}$	$3,10 \times 10^{-7}$	165	429	310	310
10^{-8}	$9,30 \times 10^{-7}$	$2,48 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$	93	248	170	170
10^{-7}	$4,02 \times 10^{-6}$	$6,96 \times 10^{-6}$	$5,67 \times 10^{-6}$	$5,67 \times 10^{-6}$	40,20	69,60	56,70	56,70
10^{-6}	$1,31 \times 10^{-5}$	$4,58 \times 10^{-4}$	$3,59 \times 10^{-4}$	$3,59 \times 10^{-4}$	13,10	45,80	35,90	35,90
10^{-5}	$1,15 \times 10^{-4}$	$2,92 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-3}$	11,50	29,20	21,60	21,60
10^{-4}	$4,85 \times 10^{-4}$	-	-	-	4,85	-	-	-



4. DISCUSION DE RESULTADOS

4. DISCUSION DE RESULTADOS.

4.1. EFFECTO DEL CMU SOBRE EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

Las observaciones realizadas sobre la influencia del CMU en el desarrollo de las diferentes especies vegetales estudiadas, tanto en tratamiento agudo como en crónico, concuerdan con los datos obtenidos por Minshall (1957), Smith y Sheets (1967) y Ashton y Crafts (1973).

De la observación de los resultados obtenidos para el tratamiento crónico, se puede deducir que, cuando la concentración de CMU en la solución nutritiva es muy pequeña (del orden de 10^{-12} M ó 10^{-11} M), no existe ningún efecto apreciable sobre el desarrollo de las mismas, cualquiera que sea la especie vegetal tratada. Para concentraciones del orden de 10^{-10} M, parece que existe, de forma invariable, un efecto estimulante, en prácticamente todas las especies vegetales tratadas y que se manifiesta por un desarrollo mejor de la planta con un mayor número de hojas en comparación con el testigo sin tratar.

Cuando se utilizan concentraciones de CMU del orden de 10^{-9} M se empiezan a observar, entre los 25 y los 28 días de tratamiento, la aparición de síntomas fitotóxicos caracterizados por manchas de color verde claro en las márgenes y porciones apicales de las hojas seguidas de otras grisáceas o plateadas y un amarilleamiento de las mismas sin llegar a un marchitamiento total.

Este fenómeno es mucho más acusado cuando se utilizan concentraciones de CMU del orden de 10^{-8} M, observándose ya diferencias apreciables de sensibilidad o resistencia características para cada especie vegetal.

Así, mientras que la cebada y el trigo presentan síntomas fitotóxicos a los 15 y 18 días de comenzar el tratamiento, el maíz, la judía y el tomate, los presentan a los 21 días del comienzo del mismo, siendo la avena la especie más resistente (25 días).

Si se utilizan concentraciones de CMU todavía superiores (10^{-7} M), los efectos fitotóxicos se manifiestan claramente para todas las especies tratadas en períodos que oscilan entre los 9 días de tratamiento para la gramínea más sensible (cebada), y 17 días para la más resistente (avena). Para esta concentración, existe ya expresión clara de letalidad con marchitamiento total y abscisión en cebada (a los 18 días), trigo y tomate (a los 21 días), judía (a los 22 días), maíz y avena (28 días) con detención, tanto del crecimiento como de la aparición de nuevas hojas.

A partir de concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M la fitotoxicidad de este herbicida es muy acusada para todas las especies vegetales estudiadas, siendo especialmente sensible el tomate, en el que aparecen síntomas de marchitamiento a los 4 días de tratamiento, y en la cebada, que aparecen a los 7 días del comienzo del mismo; en el maíz tardan 11 días en aparecer y 13 en la avena. Para esta concentración de CMU, no se desarrollan prácticamente las plantas y sólo aparecen nuevas hojas, aunque muy escasas en número, en avena y trigo. En la judía, aparecen algunos folíolos, pero las plantas no se desarrollan.

En todos los casos, la expresión clara de la letalidad puede observarse entre los 8 y los 18 días a partir del comienzo del tratamiento.

Para concentraciones de CMU aún mayores, del orden de 10^{-5} M, los síntomas fitotóxicos aparecen en la

1ª semana de tratamiento, excepto en el caso de la avena, que se manifiestan a los 10 días del comienzo del mismo, oscilando la expresión clara de letalidad entre los 4 y 6 días para las Dicotiledóneas (judía y tomate), 8 para la cebada, que es la gramínea más sensible al CMU, y 11, 12 y 14 para el maíz, trigo y avena respectivamente. En ningún caso, las plantas se desarrollan ni aparecen hojas nuevas.

Cuando se utiliza una concentración del orden de 10^{-4} M, la fitotoxicidad aparece desde el 1^{er}. día de tratamiento, excepto en el caso del trigo y de la avena, que aparece a los 3 y 6 días respectivamente del comienzo del mismo. El marchitamiento es muy rápido y se observa expresión clara de letalidad.

En resumen, se puede concluir que, en tratamiento crónico, concentraciones de CMU inferiores a 10^{-10} M no producen efecto fitotóxico objetivable en las especies vegetales estudiadas.

Concentraciones del orden de 10^{-10} M producen, en general, estimulación de las mismas con aumento, tanto de su desarrollo general como del número de hojas. Concentraciones comprendidas entre 10^{-9} M y 10^{-8} M producen efectos fitotóxicos sin llegar al marchitamiento total ni a la abscisión de las hojas, lo que ocurre - cuando se emplean concentraciones del orden de 10^{-7} M o superiores, siendo las Dicotiledóneas estudiadas (judía y tomate), más sensibles al CMU que las Gramíneas. De estas últimas, la más sensible ha sido la cebada seguida del maíz, y las más resistentes la avena y el trigo. Para concentraciones de CMU superiores a 10^{-7} M, ya existe expresión clara de letalidad en todas las especies vegetales estudiadas, siendo variable el tiempo de supervivencia de cada una de ellas.

En el caso del tratamiento agudo (durante una ~~se~~mana), se puede observar claramente un efecto detoxificante y estimulante en las plantas de trigo y judía para la concentración de 10^{-9} M. Para las otras especies vegetales ensayadas, se observa un efecto detoxificante, pero no estimulante, para concentraciones de CMU del orden de 10^{-8} M con retraso en la aparición de síntomas de marchitamiento.

Las plantas, en ambos casos, adquieren un desarrollo similar o ligeramente superior al testigo, con un número parecido de hojas.

Para concentraciones del orden de 10^{-7} M, se observa un retraso, tanto de la aparición de síntomas de marchitamiento como en la expresión de la letalidad para todas las especies tratadas, siendo más manifiesta la detoxificación en plantas de cebada, trigo y judía, en las que el número de hojas al final de la experiencia es muy similar al de las plantas testigo.

Este mismo efecto se observa para todas las Gramíneas cuando se utilizan concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M, mientras que en las Dicotiledóneas - (judía y tomate), los síntomas fitotóxicos son irreversibles. Sin embargo, para esta concentración de CMU, las Gramíneas no llegan a sufrir una detoxificación completa y, tanto el crecimiento general como el número de hojas, son menores en comparación con las plantas sin tratar.

Para concentraciones de CMU mayores a 10^{-6} M no se observa recuperación en ningún caso.

En resumen, podemos considerar que tras el tratamiento agudo, durante una semana, con diferentes concentraciones de CMU, se observa una detoxificación variable según las especies ensayadas, más acusada en las

Gramíneas y que se hace más manifiesta para aquellas concentraciones de CMU en que los síntomas fitotóxicos, por tratamiento crónico, se comenzaban a hacer claramente evidentes (10^{-8} M y 10^{-7} M), alcanzándose, en el caso de las Gramíneas, un desarrollo casi normal.

Para concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M, la detoxificación existe, pero las plántulas están tan dañadas, que tanto el desarrollo general como el número de hojas, son inferiores al normal, e incluso en ju día y tomate, el efecto fitotóxico producido ya es irreversible. Esta concentración podría considerarse la límite por encima de la cual, ya no es posible una detoxificación en ninguna de las plantas tratadas.

4.2. EFFECTO DEL CMU SOBRE LA ABSORCION RADICULAR.

De la observación de los resultados que se expresan en las Tablas XXII y XXIII, se puede deducir que el monurón se absorbe fácilmente, por vía radicular, en todas las especies vegetales ensayadas.

La velocidad de absorción del herbicida se caracteriza por una fase inicial rápida seguida de otra lenta hasta alcanzar un punto, característico para cada especie vegetal y para cada concentración de CMU, en que la velocidad de absorción tiende a cero (Smith y Sheets, 1967).

Como ya observaron García (1972) y Sancho (1975), trabajando en plantas de judía y cebada, no se puede establecer una proporcionalidad directa entre la concentración de CMU alcanzada en las hojas y la que existía inicialmente en la solución nutritiva, siendo tanto mayor la absorción relativa cuanto menor es la concentración inicial del herbicida.

Se comprueba también (Tabla XXIV), que para iguales concentraciones de CMU en la solución nutritiva, - existen diferencias apreciables de concentración de herbicida en las hojas de las diversas especies vegetales, tanto a las 24 horas como a la semana de tratamiento, diferencias que son más acusadas cuanto menor es la concentración inicial de CMU, siendo a las 24 horas de tratamiento del orden de unas 10 veces para la judía, 20 para el tomate, 25 para la cebada, 30 para el maíz, 40 para la avena y 54 para el trigo.

Al aumentar la concentración de CMU en la solución nutritiva, la diferencia de concentración en las hojas de las diversas especies vegetales tratadas se hace menor, hecho que podría explicarse por la diferen

te capacidad metabólica de cada una de las especies ve
getales ensayadas, lo que a su vez, explicaría la dife
rente sensibilidad de las especies vegetales al efecto
fitotóxico de este herbicida (Steckó, 1971).

De la presente discusión y como puede observar-
se de los resultados obtenidos en las tablas antes men
cionadas y en las figuras correspondientes, la veloci-
dad de absorción disminuye al aumentar la concentración
de CMU en la solución y al aumentar la duración de la
experiencia. Este hecho confirmaría la hipótesis de los
autores arriba mencionados sobre la existencia de un
transporte activo para la incorporación del CMU a las
raíces. Este transporte activo estaría inhibido a con-
centraciones elevadas de CMU a causa del mecanismo de
acción de este herbicida. Como ya comentamos en el pun-
to 1.3.4, el CMU afecta de modo adverso a los niveles
de producción de hidratos de carbono en las plantas -
(Cooke, 1955), y en las algas marinas (Walsch y Grow,
1971), llegando incluso a producir inhibiciones supe-
riores al 60% en las especies más susceptibles. Dismi-
nuye, por tanto, el contenido energético necesario pa-
ra todos aquellos procesos que requieren energía meta-
bólica. Este es el caso de la absorción activa, y por
tanto, cabe pensar que una disminución del contenido en
hidratos de carbono haga disminuir ostensiblemente e
incluso anule el transporte activo. Observación que es
tá de acuerdo con los trabajos de Minshall (1960).

4.3. EFFECTO DEL CMU SOBRE LA FOTOSINTESIS.

4.3.1. En hojas de planta completa.

La asimilación de CO_2 es muy sensible a la presencia de CMU, según comprobaron desde hace ya dos décadas Wessels y Van Der Ween (1956), Minshall (1957), - Ashton y col. (1961) y Davis (1966).

Trabajando con $^{14}\text{CO}_2$ en plántulas de cebada, Sancho (1975) observó que existía una inhibición gradual de la fotocarboxilación en función de concentraciones crecientes de CMU, siendo ésta completa para concentraciones de herbicida del orden de 10^{-4} M.

De los resultados de nuestras experiencias, expresados en las Tablas XXV y XXVI, puede observarse que existe un efecto análogo con diferencias significativas entre las diversas especies vegetales ensayadas.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-7} M, absorbido radicularmente durante 24 h, producen una inhibición de la asimilación de CO_2 en las plantas de cebada, avena, trigo, judía y tomate que oscila entre el 20% y el 13% respecto al testigo no tratado. En las plantas de maíz, la inhibición fue del 28%, diferencia que es significativa (P: 95%) con respecto a las demás especies tratadas.

Para concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M, se observan amplias diferencias de A.F. entre las diversas especies vegetales estudiadas. Así, mientras que en judía y tomate, la A.F. relativa es del orden del 60% respecto al testigo no tratado, en cebada y avena es aproximadamente del 50%, en trigo del 38% y en maíz del 24%. Al parecer, esta concentración es una de las más relevantes en cuanto a la objetivación de diferencias de sensibilidad al CMU entre las distintas especies tratadas.

Se puede observar que, para esta concentración, las especies menos sensibles son el tomate y la judía, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ellas, mientras que sí existe (P: 95%) con las Gramíneas.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-5} M son, en general, muy tóxicas, y aunque las diferencias de A.F. relativa entre las especies vegetales no son muy elevadas, son estadísticamente significativas (P: 99%). Los valores encontrados oscilan entre aproximadamente un 18% para judía, un 16% para tomate, un 6% para cebada y del 4% al 3% para maíz, avena y trigo.

Para concentraciones de CMU del orden de 10^{-4} M, la A.F. queda completamente inhibida en todas las especies vegetales ensayadas, confirmando los resultados obtenidos por Sancho (1975).

Cuando el tratamiento se prolonga por espacio de una semana, se puede observar que para las plantas que han absorbido radicalmente CMU a concentraciones del orden de 10^{-7} M, el valor más elevado de A.F. corresponde al trigo (75%), seguido de la judía y avena (aproximadamente el 65%), siendo las especies más sensibles el maíz (50%), el tomate (46%) y la cebada (34%). Las diferencias encontradas son significativas (P: 99%) para la cebada, maíz y tomate, y significativas con una probabilidad del 95% para la avena.

Si comparamos estos resultados con los correspondientes a la aparición de manifestaciones fitotóxicas, observadas visualmente, comprobamos que es a esta concentración cuando comienzan a objetivarse por tratamiento crónico. Al cabo de una semana, la A.F. de las distintas plantas tratadas, se ha reducido aproximadamente a la mitad y equivale a una concentración teórica

de herbicida en la hoja de unos 5×10^{-6} M para las Gramíneas, $2,5 \times 10^{-6}$ M para la judía y $2,5 \times 10^{-5}$ M para el tomate (Tabla XXIII). Se observa también, que el efecto fitotóxico producido a esta concentración de herbicida no es irreversible, pues se puede conseguir la detoxificación progresiva de las plantas hasta recuperar, al cabo de un mes, las condiciones normales de desarrollo.

Con concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M, se observa una notable disminución de la A.F. en las hojas de las diferentes especies vegetales tratadas, mostrándose como más resistentes la avena y el maíz - (10%) y más sensibles el trigo (6%), cebada, judía y tomate (3%).

Si comparamos estos datos con los síntomas fitotóxicos observados, se comprueba que existe correlación para todas las especies vegetales estudiadas, lo cual es lógico, pues, a las 24 horas de tratamiento, ya se ha alcanzado en las hojas una concentración suficiente de herbicida para que la actividad fotosintética de las mismas se haya reducido en un 50% e incluso más, para el trigo y el maíz. La concentración teórica de CMU alcanzada en las hojas es de 10^{-5} M o superior en todos los casos estudiados, por lo cual, cabría pensar que pudiera ser ésta la concentración necesaria para producir efectos letales en la judía y el tomate, mientras que en las Gramíneas, es posible todavía una detoxificación objetivamente observable aunque incompleta.

El hecho de que, para esta concentración de CMU en solución nutritiva, exista una diferencia menor de concentración teórica de herbicida en las hojas de las diferentes especies vegetales que la que existe cuando la concentración es del orden de 10^{-7} M, estaría de acuerdo con la hipótesis, ya mencionada, de la existencia

de un transporte activo que se inhibiría para concentraciones elevadas de CMU a causa del mecanismo de acción de este herbicida.

Las plantas que se han mantenido con concentraciones de CMU del orden de 10^{-5} M y 10^{-4} M no sobreviven, en la mayoría de los casos, a la semana de tratamiento, y en aquellas plantas en que no se ha observado expresión de letalidad, la A.F. de sus hojas se puede considerar casi nula y está en el límite de detección. Esto se debe a que las concentraciones teóricas alcanzadas en las hojas respectivas son del orden de 10^{-4} M en cebada, avena, trigo, judía y tomate y de $1,54 \times 10^{-5}$ M en maíz. Como puede observarse, los valores de concentración teórica de herbicida encontrados en las hojas de las diferentes especies tratadas, cada vez son más próximos.

Concentraciones del orden de 10^{-4} M en la solución nutritiva, alcanzan ya, desde las 24 h de tratamiento, concentraciones en la hoja próximas o superiores a 10^{-4} M que producen efectos letales en todas las plantas.

Como resumen, podemos decir que se observa una concordancia, en función del tratamiento, entre la aparición de síntomas fitotóxicos y la inhibición de la fotocarboxilación en plantas de las diversas especies, sometidas al mismo tratamiento.

Las diferencias entre especies son más apreciables, por tratamiento agudo para concentraciones de CMU en la solución nutritiva del orden de 10^{-6} M, y por tratamiento crónico, para concentraciones en la solución del orden de 10^{-7} M.

Como ya hemos comentado en diversos apartados, el hecho de que unas plantas sean más sensibles que otras a este herbicida y que para análogos tratamientos, las concentraciones alcanzadas en hojas de diferentes especies sean distintas, así como su A.F., puede deberse a la variabilidad metabólica inherente a cada especie vegetal tratada.

4.3.2. En cloroplastos aislados de hojas.

Los resultados obtenidos al tratar fragmentos de cloroplastos aislados de hojas de diferentes especies vegetales con diversas concentraciones de CMU, expresados en la Tabla XLI, muestran una acción inhibitoria gradual de la reacción de Hill, que es función de la concentración de herbicida y diferente según la especie vegetal considerada.

Se puede observar que, para todas las especies tratadas, la capacidad fotorreductora de los cloroplastos es sensible a concentraciones de CMU del orden de 10^{-8} M con una respuesta inhibitoria comprendida entre el 10% y el 15%, existiendo una diferencia significativa ($P = 99\%$) entre los cloroplastos de judía, que son los más resistentes para esta concentración, y los de trigo y tomate, que son los más sensibles.

Al aumentar la concentración de inhibidor, disminuye la capacidad reductora de los cloroplastos y así, para concentraciones del orden de 10^{-7} M, se observa una disminución que oscila entre aproximadamente un 26% para el tomate, un 20% para avena y trigo, un 14% para maíz y judía y un 11% para cebada, con una diferencia significativa ($P = 99\%$) entre la cebada y la avena, trigo y tomate.

Cuando se utilizan concentraciones de CMU del orden de 10^{-6} M, la capacidad reductora de los cloroplastos, disminuye notablemente, encontrándose que, para judía y tomate, ésta es la concentración que produce el PI₅₀, dato que concuerda con los encontrados por Wessels y Van Der Veen (1956), Bishop (1958), Gingras y col. (1953), Gingras y Lemasson (1965), García (1972) y Sancho (1975).

Para avena y maíz, la inhibición ha sido de aproximadamente el 40%, para trigo del 33% y para cebada, que se muestra como más resistente, del 27%, existiendo una diferencia significativa ($P = 99\%$) entre los valores encontrados para esta especie y los correspondientes a avena, maíz, judía y tomate.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-5} M, producen inhibición superior al 50% en todos los cloroplastos tratados. Como se ha observado a lo largo de toda la experiencia, los cloroplastos de cebada y judía son los más resistentes, mientras que los de tomate son los más sensibles, siendo intermedios, y de un orden parecido, los de avena, trigo y maíz. La diferencia encontrada entre la inhibición de la capacidad fotorreductora de los cloroplastos de cebada y los de las demás especies estudiadas ha sido significativa ($P = 99\%$).

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-4} M, producen una inhibición de la capacidad fotorreductora de los cloroplastos de judía de aproximadamente el 89%, en los de cebada, avena y trigo de un 94% y es superior al 96% para los de maíz y tomate. Para esta concentración se puede considerar que la inhibición es casi completa, existiendo una diferencia significativa ($P = 99\%$) entre la producida en cloroplastos de judía y en los de las demás especies estudiadas.

Se ha encontrado una correlación entre la actividad fotorreductora (Afr) de cada una de las especies vegetales estudiadas y la concentración de CMU (Tabla XLII).

Esta correlación es lineal y satisface a la ecuación de la recta:

$$H = A + B \log_{10} C$$

para concentraciones de $CMU \geq 10^{-7}$ M, excepto en el caso de la cebada que lo es para concentraciones de $CMU \geq 10^{-6}$ M; mientras que, para concentraciones de $CMU \leq 10^{-7}$ M, con la excepción ya mencionada de la cebada, que es la especie que se ha mostrado significativamente más resistente ($P = 99\%$). Para la mayoría de las concentraciones estudiadas, la correlación existente satisface a la ecuación de la hipérbola:

$$H = \frac{100 \log_{10} C + D}{E + \log_{10} C}$$

en la que:

- H = Capacidad fotorreductora
- C = Concentración de CMU
- A y B = Constantes de la recta
- D y E = Constantes de la hipérbola

Si comparamos los resultados obtenidos con los publicados por los autores antes mencionados, se puede observar que, en general, el PI_{50} se ha calculado directamente a partir de la concentración de inhibidor añadida a la mezcla de reacción, lo que no prueba cuál es la concentración real de herbicida en el interior del cloroplasto capaz de actuar en la reacción de inhibición pues, una parte de este herbicida puede

asociarse a compuestos que no intervienen en la reacción fotoquímica y que, por lo tanto, no participan en la respuesta inhibitoria.

El comportamiento de los inhibidores de la reacción de Hill, ha sido evaluado por Hansch (1969) por análisis de regresión múltiple, incluyendo en sus ecuaciones términos relativos a factores o constantes electrónicos, estéricos, de polaridad y de coeficiente de partición y ha establecido una relación entre el PI expresado en función de la reacción de Hill y los parámetros físico-químicos de un determinado grupo de herbicidas, lo que permite considerar a la reacción de Hill como un sistema "in vitro" capaz de identificar la fitotoxicidad potencial de un grupo de productos químicos e indica la sensibilidad que podría esperarse si la molécula de herbicida alcanzase los cloroplastos sin sufrir ninguna alteración previa. Sin embargo, "in vivo", existen muchos factores que pueden impedir que la molécula original del herbicida alcance los cloroplastos, como son: comportamiento y disponibilidad del inhibidor en el suelo, absorción radicular, traslocación en la planta, biotransformación con posibilidad de dar lugar a metabolitos más tóxicos que el producto de origen y sensibilidad específica inherente a cada especie vegetal y que García (1972) expresa como relación CMU-clorofila necesaria para producir el PI_{50} en cada especie considerada.

Esta sensibilidad específica no se manifiesta sólo frente a los distintos inhibidores; ya los cloroplastos sin tratar muestran una AFr diferente. Como puede observarse en las Tablas XXXV (cebada), XXXVI (avena), XXXVII (trigo), XXXVIII (maíz), XXXIX (judía) y XL (tomate), los valores de AFr de los cloroplastos sin tratar de cada una de las especies vegetales mencionadas,

expresados en $\mu\text{mol O}_2 (\text{mg clorofila}^{-1}) \cdot \text{min}^{-1}$ son respectivamente: 0,4264; 0,4249; 0,3781; 0,3153; 0,4132 y 0,4835, valores que se han considerado como el 100% de respuesta.

Los cloroplastos de tomate que presenta una AFr mayor, son los más sensibles a la acción del CMU, mientras que los de cebada y avena, que tienen una AFr similar, presentan una sensibilidad muy diferente, propia de cada especie, para este inhibidor de la reacción de Hill.

De lo dicho anteriormente se comprende la dificultad que existe para comparar los resultados obtenidos al determinar el efecto del CMU en la A.F. de hojas de planta completa en los que intervienen todos los factores mencionados, con los encontrados en la reacción de Hill. Así, mientras que por absorción radicular, se han mostrado más sensibles al CMU las Dicotiledóneas, y la cebada, en cloroplastos aislados, la cebada y la judía son las especies más resistentes.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-7} M, absorbidas radicularmente durante 24 h, que corresponden a una concentración en las hojas de unos 10^{-6} M a 5×10^{-5} M, producen una inhibición en la asimilación de CO_2 en plantas de cebada, avena, trigo, judía y tomate que oscila entre el 20% y el 13% con respecto al testigo no tratado, y del 28% en las de maíz, mientras que una concentración de ese orden en la cubeta que contiene los cloroplastos, en la reacción de Hill, produce aproximadamente el 50% de inhibición para la mayoría de las especies tratadas, con excepción de la cebada que, como hemos comentado, se muestra más resistente. Esto indica que del total de CMU que alcanza la hoja, no todo es biológicamente activo ni se une por igual

a los centros activos e incluso, puede haberse biotrans formado dando origen a compuestos de diferente toxicidad que podrían explicar las diferencias de resistencia o sensibilidad encontradas para las distintas especies en los distintos estudios realizados.

A conclusiones análogas llegaríamos si comparamos concentraciones mayores de CMU, del orden de 10^{-6} M, aunque en este caso, habría que considerar también, la influencia de otros efectos tóxicos que este herbicida produce sobre la absorción y el transporte activo que tienen su origen en el efecto producido sobre el metabolismo glucídico y que ya se ha discutido en el punto 4.2. Este efecto se pone bien de manifiesto en las Tablas LXXV y LXXVI, en que se comparan la A.F. relativa, en planta completa, con la respuesta que se obtendría en la Reacción de Hill si a la cubeta de reacción se añadiera la concentración de CMU que teóricamente se alcanza en las hojas de las diversas especies después de 24 h y 7 días de tratamiento.

Es necesario señalar una característica de los inhibidores de la reacción de Hill, que es la reversibilidad de su acción, es decir, que pueden ser eluidos fácilmente de los cloroplastos, con recuperación de la actividad de Hill, lo que sugiere que este inhibidor se une al centro de reacción en el cloroplasto por enlaces de hidrógeno (Hansch, 1969). Este hecho explicaría la detoxificación observada en las plantas sometidas a tratamiento agudo durante una semana, cuando la concentración de herbicida en la solución nutritiva es $\leq 10^{-7}$ M y que se ha discutido en el punto 4.1.

En conclusión, podemos decir que el CMU es un inhibidor de la reacción de Hill y que actúa interrumpiendo el transporte electrónico, por lo que impide la

TAULA 121V.- Efecto comparativo de la inhibición de la Actividad Fotosintética (A.F.) por diversas concentraciones de CMU en fragmentos de cloroplastos (Recalcado de H11) y en hojas de plantas tratadas con CMU durante 24 horas.
Los valores de A.F. relativos en cloroplastos aislados, para las concentraciones utilizadas, están señalados por extrapolación, utilizando las ecuaciones de la Tabla IIII.

(CMU) en la solución (M)	Cebada			Avena			Trigo			Maíz			Judía			Tomate		
	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)	R. de H11 (S)	A.F. (S)	(CMU) en hoja (M)
0	0	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0
10^{-7}	$2,48 \times 10^{-6}$	60,87	$3,98 \times 10^{-6}$	46,23	83,44	$5,54 \times 10^{-6}$	45,94	83,40	$1,01 \times 10^{-6}$	51,20	72,22	$1,05 \times 10^{-6}$	64,29	83,61	$2,03 \times 10^{-6}$	45,46	84,10	
10^{-6}	$1,53 \times 10^{-5}$	39,06	$1,86 \times 10^{-5}$	29,40	52,33	$3,62 \times 10^{-5}$	35,40	39,20	$6,51 \times 10^{-6}$	42,29	24,05	$6,28 \times 10^{-6}$	45,00	56,88	$1,85 \times 10^{-5}$	22,61	60,31	
10^{-5}	$2,71 \times 10^{-5}$	12,20	$1,20 \times 10^{-4}$	9,04	3,32	$1,02 \times 10^{-4}$	11,61	2,81	$1,49 \times 10^{-5}$	32,58	5,9	$2,44 \times 10^{-5}$	31,08	15,05	$8,10 \times 10^{-5}$	7,14	17,69	
10^{-4}	$8,50 \times 10^{-5}$	18,94		6,10	0,26		0,23	0,12	$8,71 \times 10^{-5}$	11,91	0,9		0,50	0,30	$1,81 \times 10^{-4}$			

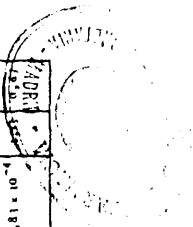


TABLE LXIV.- Efecto comparativo de la inhibición de la actividad fotosintética (A.F.) por diversas concentraciones de CHU en fragmentos de cloroplastos (Rasocida de H11) y en hojas de plantas tratadas con CHU durante 7 días.

Los valores de A.F. relativa en cloroplastos aislados, para las concentraciones utilizadas, están calculados por extrapolación, utilizando las curvas de la Tabla LIIF.

(CHU) en la activación (M)	Cebada			Avena			Trigo			Maíz			Judía			Tomato		
	(CHU) en hoja (M)	N. de H111 (S)	A.F. (S)	(CHU) en hoja (M)	N. de H111 (S)	A.F. (S)	(CHU) en hoja (M)	N. de H112 (S)	A.F. (S)	(CHU) en hoja (M)	N. de H112 (S)	A.F. (S)	(CHU) en hoja (M)	N. de H111 (S)	A.F. (S)	(CHU) en hoja (M)	N. de H111 (S)	A.F. (S)
0	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100	0	100	100
10^{-7}	$5,67 \times 10^{-6}$	90,96	33,92	$4,55 \times 10^{-6}$	44,77	61,14	$6,59 \times 10^{-6}$	44,01	75,40	$4,86 \times 10^{-6}$	45,69	40,29	$2,56 \times 10^{-6}$	55,18	66,87	$2,58 \times 10^{-5}$	19,18	46,12
10^{-6}	$2,96 \times 10^{-5}$	31,22	2,85	$2,38 \times 10^{-5}$	26,71	10,2	$1,55 \times 10^{-4}$	15,06	5,48	$9,59 \times 10^{-6}$	37,73	9,6	$1,49 \times 10^{-5}$	32,49	2,99	$1,93 \times 10^{-5}$	5,24	3,13

reducción del DPIP por el citocromo b o la plastoquinona reducida. La acción inhibidora es función de la concentración de herbicida, quedando totalmente inhibida para concentraciones en la cubeta de reacción superiores a 10^{-4} M.

El efecto es reversible, pudiendo recuperarse la capacidad fotorreductora por elución de los cloroplastos.

Es de señalar que este método proporciona un sistema "in vitro" sencillo y útil, que permite identificar la toxicidad potencial de un herbicida o grupo de herbicidas, e indica la sensibilidad que podría esperarse si la molécula original de herbicida alcanzase los cloroplastos. Sin embargo, los valores encontrados no pueden correlacionarse estrechamente con los proporcionados por un método "in vivo", debido a los innumerables factores que impiden que la molécula de herbicida sin transformar alcance los centros activos del cloroplasto.

4.3.3. En Chlorella.

Desde que en el año 1919, Warburg introdujo el alga unicelular Chlorella en sus estudios sobre fotosíntesis, son numerosos los autores que han utilizado este organismo en sus trabajos de investigación. En lo que respecta a aspectos concretos de su utilización como bioensayo, cabe destacar los trabajos realizados por Gingras (1966), Addison y Bardsley (1968), Kratky y Warren (1971 a, b), Sargent y Taylor (1972), Stuart y Gaffron (1972 a, b) y Cheniae y Martin (1973), aunque, en realidad, están enfocados principalmente a la determinación de residuos de herbicidas en suelos pero no en tejidos vegetales.

En nuestro trabajo, hemos tratado una suspensión de *Chlorella pyrenoidosa* con diversas concentraciones de CMU, observando que se produce una inhibición gradual de su actividad fotosintética que, como puede observarse en la Tabla XLIII, es función de la concentración de herbicida.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-10} M producen una inhibición del desprendimiento neto de O_2 por la suspensión de algas de alrededor del 5%, lo que nos induce a decir que el método polarográfico, utilizando *Chlorella*, es más sensible que el de la reacción de Hill, que emplea cloroplastos aislados de hojas de plantas tratadas.

Concentraciones de CMU del orden de 10^{-9} M producen una inhibición del desprendimiento de O_2 de un 25%.

Al ir aumentando la concentración de herbicida, la A.F. del alga *Chlorella* disminuye, hasta llegar a un 9% para concentraciones de CMU del orden de 10^{-5} M.

Cuando la concentración de CMU es del orden de 10^{-4} M, se puede considerar que el desprendimiento neto de O_2 es prácticamente nulo.

Se ha encontrado una correlación entre la A.F. del alga *Chlorella* y la concentración de CMU que satisface a la siguiente ecuación de la recta:

$$A.F. = A + B \log_{10} C$$

en la que:

A.F. = Actividad fotosintética

C = Concentración de herbicida

A y B = Constantes de la recta que, en nuestro caso, adquieren los valores de -84,4746 y -17,93 respectivamente.

Es difícil establecer una comparación entre los resultados encontrados por nosotros y los de la bibliografía por la diversificación de los métodos analíticos utilizados, así como por las diferentes procedencia y cepa de las algas, contenido en Clorofila y condiciones de cultivo, luz y temperatura empleadas en cada ensayo.

Si realizamos un estudio analógico, podemos observar que Geoghegan (1957) y Maloney (1958), utilizan un método turbidimétrico, encontraron que concentraciones de CMU del orden de $2,5 \times 10^{-6}$ M inhibían el crecimiento normal de 33 especies diferentes de algas, después de permanecer durante 1 semana con este herbicida. Addison y Bardsley (1968), por el mismo método, analizaron residuos de diurón y atrazina en extractos de suelos y lo compararon con el método del crecimiento de la avena, demostrando su utilidad en cuanto a que permite detectar pequeñas concentraciones tóxicas, desde el punto de vista biológico de estos herbicidas.

Cheniae y Martin (1973), trabajando con *Chlorella vulgaris* sin tratar con inhibidor y utilizando un método polarográfico, han encontrado unos valores de desprendimiento de O_2 fotosintético de 15,9 μ moles de O_2 /mg Clorofila/min, que son bastante próximos a los nuestros, que corresponden a 22,2 μ moles de O_2 /mg Clorofila/min.

En los trabajos de Gingras (1966), que emplea también un método polarográfico, se obtiene el PI_{50} de la A.F. de una suspensión de *Chlorella*, mantenidas a $20^\circ C$ para concentraciones de CMU de 3×10^{-7} M, que son también del mismo orden que las encontradas por nosotros.

Con respecto a la actividad respiratoria en la oscuridad, se observa en la Tabla XLIII que la depen--

dencia de la concentración no es tan fuerte como en el caso de la fotosíntesis, así, el efecto tóxico empieza a observarse a partir de 10^{-9} M de CMU y disminuye de forma gradual, pero no tan marcada como para la A.F., alcanzándose el PI_{50} para concentraciones de herbicida de 10^{-4} M, concentración para la cual la respuesta fotosintética es despreciable.

El hecho de que los efectos del CMU sean mucho más marcados sobre el desprendimiento de O_2 a la luz, que sobre la respiración en la oscuridad, nos ha permitido seleccionar la respuesta fotosintética de *Chlorella* como base para el desarrollo de nuestro bioensayo.

Si se compara el efecto inhibitor del CMU sobre la A.F. de algas con el correspondiente obtenido con cloroplastos aislados de las hojas de las especies estudiadas (Tabla LXXVII), se observa que la *Chlorella* es bastante más sensible que los cloroplastos aislados, ya que se manifiesta una cierta sensibilidad para concentraciones de CMU del orden de 10^{-10} M y es significativamente marcada para concentraciones de herbicida de 10^{-9} M, siendo la inhibición producida en la A.F. superior al 90% para concentraciones de herbicida de 10^{-5} M.

En cloroplastos aislados de hojas de las diversas especies tratadas, la sensibilidad al CMU comienza a notarse de forma marcada para concentraciones 100 veces mayores (10^{-7} M). A concentraciones de CMU de 10^{-5} M, la reducción en la A.F. oscila entre el 60% y el 70%.

En resumen, podemos decir que, el método polarográfico utilizando *Chlorella* como organismo de bioensayo, es útil y sensible para detectar pequeñas concentraciones tóxicas de herbicida, siendo su sensibilidad mayor que la del que utiliza cloroplastos aislados y más realístico en cuanto a que determina "in vivo" los efectos tóxicos de los inhibidores.

TABLA LXXVII.- Comparación de la A.F. relativa al testigo obtenido en Chlorella (Método polarográfico) y cloroplastos de diversas especies (reacción de Hill), tratados con diversas concentraciones de CMU.

Los valores de A.F. relativa en cloroplastos aislados para las concentraciones utilizadas están calculados, por extrapolación - utilizando las ecuaciones de la Tabla XLII.

Especies Tratamiento		Cloroplastos aislados de:						Algas
		Cebada	Avena	Trigo	Maíz	Judía	Tomate	
0		100	100	100	100	100	100	100
10 ⁻¹⁰		-	-	-	-	-	-	95,22
10 ⁻⁹		-	-	-	-	-	-	75,02
10 ⁻⁸		97,33	91,45	83,67	94,59	93,86	86,47	63,48
10 ⁻⁷		90,33	86,46	81,61	39,50	88,70	76,60	33,64
10 ⁻⁶		71,83	60,48	69,95	64,20	64,90	52,79	18,27
10 ⁻⁵		44,16	36,18	39,39	37,25	44,10	28,98	9,12
10 ⁻⁴		16,55	11,04	13,83	10,30	17,30	5,17	-

4.4. EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE PLANTAS TRATADAS CON CMU SOBRE LA FOTOSINTESIS DEL ALGA CHLORELLA PYRENOIDOSA.

4.4.1. Curvas de calibrado.

Al comparar los resultados del efecto del CMU sobre una suspensión de Chlorella (Tabla XLIII), con los correspondientes a la suspensión de Chlorella con extractos de las diversas plantas estudiadas (Tablas XLIV, LXV, XLVI, XLVII, XLVIII y XLIX), se observa que la A.F. de la Chlorella es diferente dependiendo del efecto que produce el extracto de cada una de las especies vegetales sobre la A.F. de este organismo.

Estas diferencias se reflejan en la Tabla LXXVII en la que se han resumido los resultados de las Tablas arriba mencionadas.

Debido a que los extractos de las hojas de las diferentes especies poseen una coloración distinta por su diferente contenido en clorofila, la D.O. resultante en la suspensión de Chlorella es mayor que cuando no hay extracto de planta añadido. Además, como fácilmente se puede comprender, la concentración del extracto de hoja ha de ser grande con el fin de poder detectar el CMU.

Dado que en la determinación de la A.F. de Chlorella pyrenoidosa por el método del electrodo de O_2 , la iluminación de las Chlorellas en la cubeta de reacción viene afectada por la coloración del extracto, la iluminación que reciben las Chlorellas de la suspensiones menor que cuando no tienen extracto y, por ese motivo, el desprendimiento neto de O_2 es menor.

TABLA LXXVIII.- Efecto de diversas concentraciones de CMU sobre el desprendimiento de O₂ en suspensiones de Chlorella pyrenoidosa sin extracto y con extractos de hojas procedentes de diversas especies vegetales.

Especies Tratamiento	Algas con extractos de hojas de plantas de :						Algas sin extracto
	Cebada	Avena	Trigo	Maiz	Judia	Tomate	
0	100	100	100	100	100	100	100
10 ⁻¹⁰	96,73	98,72	96,89	96,40	99,47	79,99	95,22
10 ⁻⁹	95,37	93,39	93,76	89,30	97,48	72,00	75,02
10 ⁻⁸	30,03	86,72	84,35	82,15	87,43	68,00	63,48
10 ⁻⁷	40,01	66,70	99,33	71,44	63,37	60,00	33,64
10 ⁻⁶	23,32	41,83	21,87	10,00	47,53	36,00	18,27
10 ⁻⁵	15,50	20,01	9,30	21,43	12,77	20,00	9,12
10 ⁻⁴	-	-	-	-	3,76	3,00	-

Los extractos se han obtenido a partir del mismo peso de hoja de partida, por lo que, los diferentes extractos resultantes tienen diferente concentración en clorofila, y el grado de atenuación luminosa que producen, también es diferente y, por tanto, también lo será la respuesta fotosintética.

Este efecto se refleja claramente en las Tablas XLIII, XLIV, XLV, XLVI, XLVII, XLVIII y XLIX en las que puede observarse que la A.F. de las algas viene afectada cuantitativamente de modo diverso para cada una de las plantas.

Así, para *Chlorella sola*, se ha estandarizado la respuesta, sin inhibidor, para un desprendimiento neto de O_2 correspondiente a $0,5746 \mu\text{mol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} (\text{mg clorofila})^{-1}$ y los valores encontrados al añadir el extracto de las diferentes plantas son respectivamente de: 0,294 para la cebada, 0,351 para la avena, 0,351 para el trigo, 0,286 para el maíz, 0,350 para la judía y 0,312 para el tomate. Las diferencias observadas entre la A.F. relativa de las algas sin extracto y con extracto de las diferentes plantas han sido estadísticamente significativas, con una probabilidad del 95% para la avena y el trigo y con una probabilidad del 99% para la cebada, maíz y tomate. Con respecto a la judía, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

La correlación existente entre la capacidad fotosintética de *Chlorella pyrenoidosa* y la concentración de CMU añadida a extractos de hojas de las diversas especies vegetales (Tabla L) satisface a la ecuación de la recta:

$$A.F. = A + B \log_{10} C$$

para concentraciones de CMU $\geq 10^{-7,96} \text{ M}$

y a la de la hipérbola:

$$A.F. = \frac{100 \log_{10} C + D}{E + \log_{10} C}$$

para concentraciones de CMU $\leq 10^{-7,96}$ M

en las que:

A.F. = actividad fotosintética relativa

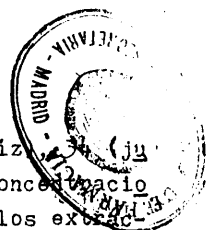
C = concentración de CMU

A y B = constantes de la recta

D y E = constantes de la hipérbola

A partir de las ecuaciones de regresión correspondientes para cada especie vegetal, se pueden calcular las concentraciones estimadas de CMU en los extractos de hojas correspondientes que lo han absorbido radicalmente, y a partir de los cálculos adecuados, la concentración de CMU alcanzada en las respectivas hojas en función del tratamiento efectuado.

En conclusión, se puede decir que, para utilizar el alga *Chlorella pyrenoidosa* en la determinación de los residuos de herbicidas presentes en hojas de plantas, se necesita realizar previamente una curva de calibrado utilizando extractos de plantas de la misma especie que se quiere analizar, sin tratar con CMU. La utilización de este extracto es también necesaria para contrarrestar el efecto de cualquier sustancia natural que pudiera estar presente en el mismo y que afectara, de forma indirecta, la A.F. de *Chlorella* ya que, obteniendo siempre el extracto de la misma forma, la influencia de esta hipotética sustancia sería análoga. A partir de los datos obtenidos con los diferentes extractos y distintas concentraciones de CMU se obtienen las curvas de calibrado que se representan en las figuras



30 (cebada), 31 (avena), 32 (trigo), 33 (maíz), 34 (judía) y 35 (tomate) y sirven para calcular concentraciones desconocidas de herbicida presentes en los extractos de hojas a partir de los datos de A.F. relativa con respecto al control sin CMU.

La sensibilidad del método vendrá condicionada por el oscurecimiento producido por el extracto correspondiente. En el caso de que se quisiera estudiar el efecto de extractos de otros órganos o incluso de suelos, habría que proceder, de manera análoga, a realizar una curva de calibrado por las mismas consideraciones que acabamos de expresar más arriba.

4.4.2. Evaluación de la concentración de CMU alcanzado en las hojas de plantas tratadas.

Observando los resultados de las Tablas LI a la LKVIII, que reflejan el efecto de los extractos de plantas tratadas durante 24 h y 7 días con CMU por absorción radicular y los correspondientes a las Tablas LIX a la LXIV en los que se refleja la concentración de CMU alcanzada en las hojas deducidas de las tablas anteriores por aplicación de las ecuaciones correspondientes, según se indicó en el punto 3.5.2, se pone de manifiesto que la utilización de *Chlorella pyrenoidosa* como bioensayo, ofrece grandes posibilidades para la detección de este tipo de herbicida.

Como ya se ha comprobado con los otros métodos utilizados, se sigue produciendo un incremento en la concentración de CMU en las hojas respecto a la concentración que tenía el CMU en la solución nutritiva y que es variable según la especie vegetal ensayada y el tipo de tratamiento utilizado, resultados que son del

mismo orden que los obtenidos por el método que utiliza el CMU- ^{14}C (Tabla XXIV) según se detalló en el apartado 4.2.

Con respecto a la sensibilidad del método, se observa que con este bioensayo, se pueden apreciar concentraciones de herbicida de un orden de magnitud comprendido entre 100 y 1000 veces inferiores a las que se obtienen con isótopos radiactivos. Esto es debido a que la actividad específica del CMU- ^{14}C es pequeña y no se pueden obtener concentraciones inferiores a 10^{-7} M con actividad suficiente como para detectar la cantidad de CMU- ^{14}C contenido en las hojas.

La ventaja de utilizar el bioensayo con *Chlorella*, aparte de la mayor sensibilidad, estriba en que el resultado obtenido da directamente la actividad biológica del producto herbicida presente en el extracto, sin tener necesidad de recurrir a separaciones o purificaciones cromatográficas, con objeto de aislar el o los productos activos, con la consiguiente dificultad en el caso de que existan intermediarios activos desconocidos. Por otra parte, el empleo de isótopos radiactivos aplicados como trazadores para detectar concentraciones del producto en hojas utilizando la técnica de la dilución isotópica, presenta muchas limitaciones y sólo podría realizarse en laboratorios adecuados.

Comparando la sensibilidad del bioensayo con *Chlorella* respecto a los métodos químicos o físico-químicos descritos en el punto 1.4.1, se observa que, aparte de la ventaja arriba mencionada que supone el tener el valor biológico del producto directamente, la sensibilidad es también mayor, ya que en los mejores casos, utilizando métodos de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama o cromatografía líquido-líquido de alta presión, la detección es del orden de

1 a 10 ng. En lo que respecta a la reproducibilidad del método, es muy buena y sólo es preciso vigilar rigurosamente las condiciones de cultivo del alga seleccionada y realizar el número suficiente de determinaciones para que el tratamiento estadístico aplicado sea correcto.

4.5. PROPUESTA DE UN BIOENSAYO PARA EVALUAR RESIDUOS DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA A.F.

Teniendo en cuenta las consideraciones del punto anterior, se podría establecer un bioensayo en el que, utilizando el alga *Chlorella pyrenoidosa* como elemento sensor, se podría determinar la concentración de cualquier producto herbicida inhibidor de la fotosíntesis, ya que los resultados obtenidos en este trabajo para el CMU, pueden ser extrapolados a otros compuestos tales como los restantes derivados de la urea (diurón, neburón) o para aquellos otros que producen un efecto inhibidor sobre el transporte electrónico en las reacciones fotosintéticas como son los fenilcarbamatos, las ureas policíclicas, las acil anilidas, las 5-triazinas, diazinas, uracilos, 4-hidroxibenzonitrilos, indazoles, etc.

La limitación de este método radica en que sólo será aplicable cuando se tenga la certeza de que en el tratamiento herbicida se ha utilizado un solo tipo de compuesto, ya que, en el caso de que hubiera mezclados varios productos con propiedades inhibitoras de la A.F., el resultado obtenido nos indicaría el efecto global inhibidor, pero no se podrían discriminar los efectos debidos a cada uno de los herbicidas por separado.

Para utilizar este procedimiento se requieren - los siguientes elementos:

- 1) Cultivo sincrónico continuo de *Chlorella pyrenoidosa* crecidas en condiciones asépticas (o de alguna otra alga fotosintética unicelular).
- 2) Equipo medidor de O_2 en soluciones acuosas (electrodo de oxígeno).



- 3) Colorímetro para la determinación de la ^{4.0} de los cultivos y del contenido clorofílico en al-
gas y/o extractos.
- 4) Material usual de laboratorio.
- 5) Reactivos adecuados según se indica en los apar-
tados 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4.3, 2.4.4.4 y 2.5.1.

Procedimiento a seguir:

En primer lugar, se comprueba la respuesta foto sintética de la suspensión de algas seleccionadas como organismo sensor. Se preparan extractos de hojas de - plantas no tratadas, según se indica en el punto 2.5.1 y se procede a la realización de una curva de calibra- - ción con diferentes concentraciones del herbicida que se quiera detectar. Una vez ajustada la correspondiente - ecuación de regresión, se puede proceder a la realiza- ción del ensayo de extractos de hojas de plantas trata- das cuyo contenido en herbicida se quiera determinar y según los valores obtenidos para la A.F., referidos al testigo, no tratado, se determina la concentración de herbicida contenida en el extracto. Aplicando la ecua- ción de regresión correspondiente y a partir de este dato, se puede calcular la cantidad de herbicida pre- sente por unidad de peso del material vegetal estudia- do.

Para la realización práctica de este tipo de tra- bajo bastará con tener en cuenta los puntos 2.4.1, - 2.4.2, 2.4.3, 2.4.4, 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 y 2.5.4, del apartado Material y Métodos.

5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1º) Con respecto a los efectos producidos por la absorción radicular de CMU sobre el desarrollo de las plantas estudiadas, se observa que los síntomas fitotóxicos empiezan a manifestarse para concentraciones de CMU en la solución nutritiva $\geq 10^{-9}$ M, siendo las especies Dicotiledóneas más sensibles que las Gramíneas; dentro de éstas, la avena y el trigo se comportan como las más resistentes. Para concentraciones $\geq 10^{-7}$ M, ya existe expresión clara de letalidad en todas las especies vegetales estudiadas, siendo variable el tiempo de supervivencia de cada una de ellas. Concentraciones de CMU $< 10^{-9}$ M no producen efectos fitotóxicos sensibles, e incluso, en la concentración de 10^{-10} M se observa un claro efecto estimulante sobre el desarrollo de las plantas.
- 2º) Tras un período de absorción radicular de CMU de una semana, si se trasladan las plantas a una solución sin CMU, se puede observar una detoxificación de éstas, siempre que la concentración del herbicida en la solución nutritiva haya sido inferior a 10^{-6} M, ya que para concentraciones iguales o superiores, el efecto es irreversible.
- 3º) Con respecto al proceso de absorción radicular del CMU y la acumulación de este herbicida en las hojas de las plantas, se observa que existe un proceso de absorción activa, que hace que la concentración que se llegue a alcanzar en las hojas sea varias veces

superior a la concentración del producto en la solución nutritiva de la que procede.

Este proceso de absorción activa alcanza distinta intensidad según la especie (es más acusado en el trigo y la avena y menos en la judía y el tomate) y se pone de manifiesto, con más claridad, para las concentraciones bajas de CMU, ya que para concentraciones elevadas de este herbicida, la inhibición fotosintética producida actúa indirectamente sobre la capacidad de absorción activa de las células.

- 49) Con respecto a la acción del CMU sobre la asimilación fotosintética del CO_2 por las hojas de las diversas especies, se observa que los efectos inhibidores se producen para concentraciones de herbicida en la solución nutritiva $\geq 10^{-7}$ M, siendo el grado de inhibición alrededor del 20% para esta concentración, aunque varía para las diversas especies vegetales. Concentraciones de CMU $\geq 10^{-5}$ M son muy tóxicas y el grado de inhibición de la fotosíntesis oscila alrededor del 90%, siendo en este caso las Gramíneas más sensibles que las Dicotiledóneas, tal vez por el mayor poder de concentración activa del herbicida en la hoja de aquéllas, según se indicó en el punto anterior.

- 50) A nivel de cloroplastos aislados o fragmentos de éstos, el efecto inhibidor sobre la reacción de Hill es análogo para todas las especies estudiadas, existiendo una correlación directa entre el poder inhibidor y la concentración de herbicida para valores comprendidos entre 10^{-3} M y 10^{-4} M.

El efecto dosis-respuesta para cloroplastos aislados, es de un orden parecido al observado en las

hojas de las plantas, si se tiene en cuenta la concentración que el herbicida alcanza en las hojas tras un proceso de absorción radicular.

69) El poder inhibidor del CMU sobre el desprendimiento fotosintético de O_2 del alga *Chlorella pyrenoidosa*, se manifiesta entre concentraciones del orden de 10^{-10} M y 10^{-4} M, pudiéndose establecer una correlación lineal entre la A.F. del alga y el logaritmo de la concentración de herbicida. La sensibilidad del método polarográfico para la evaluación de concentraciones de CMU por detección del O_2 desprendido en cultivos de algas, es del orden de 100 veces superior a la sensibilidad del método colorimétrico que se utiliza en la reacción de Hill para cloroplastos aislados.

70) Aprovechando la alta sensibilidad del método polarográfico para la determinación del desprendimiento de O_2 fotosintético en *Chlorella*, se puede establecer un bioensayo para evaluar residuos de herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, en suelos o restos vegetales, teniendo este método la ventaja de expresar directamente la actividad biológica del producto herbicida sin necesidad de recurrir a separaciones o purificaciones por métodos químicos o físico-químicos.

El método es sensible, rápido, reproducible y sencillo, pudiéndose adaptar a análisis rutinarios sin requerir la utilización de equipos de elevado coste.

6. BIBLIOGRAFIA



6. BIBLIOGRAFIA.

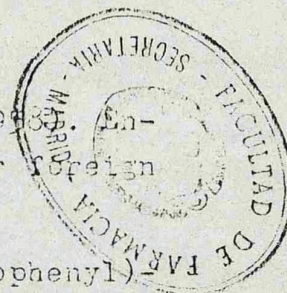
- ABBOTT, D.C., BLAKE, K.W., TARRANT, K.R. y THOMSON, J. (1967). Thin-layer chromatographic separation, identification and estimation of residues of some carbamate and allied pesticides in soil and water. *J. Chromat.* 30, 136-142.
- ADDISON, D.A. y BARDSLEY, C.E. (1968). *Chlorella vulgaris* Assay of the Activity of Soil Herbicides. *Weed Sci.* 16, 427-429.
- AOAC. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (1975). 12th Edition Association of Official Analytical Chemists.
- ARDITTI, J. y DUHN, A. (1969). Experiments in cellular and Plant Physiology. App. I, pág. 250-253. En *Experimental Plant Physiology*. Holt Rinehart and Winston, Inc.
- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant-Physiol.* 24 : 1-15.
- ARNON, D.I.; WHATLEY, F. y ALLEN, M. (1954). Photosynthetic phosphorylation, the conversion of light into phosphate bond energy. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 6324.
- ASAHI, T. y JAGENDORF, A.T. (1963). A spinach enzyme functioning to reverse the inhibition of cyclic electroc flow by p-chlorophenyl-1,1-dimethyl-urea at high concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* 100 : 531-541.
- ASHTON, F.M. (1965). Relationship between light and toxicity symptoms caused by atrazine and monuron. *Weeds*, 13, 164-168.

- ASHTON, F.M., URIBE, E.G. y ZWEIG, G. (1961). Effect of monuron on $^{14}\text{CO}_2$ fixation by red kidney beans. Weeds, 9, 575-579.
- ASHTON, F.M. y CRAFTS, A.S. (1973). Mode of action of Herbicides, págs. 367-393. A Wiley and Sons Pub. New York, 1973.
- ASKEW, J., RUZICKA, J.H. y WHEALS, B.B. (1968) Use of hydriodic acid in the detection of pesticides after thin-layer chromatography. J. Chromat. 32, 369-372.
- ATKINS, C.A. y TCHAN, Y.T. (1967). Study of soil algae VI. Bioassay of atrazine and the prediction of its toxicity in soils using an algae growth method. Pl. soil, 27, 432-442.
- AXELROD, J. (1956). The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 117, 322-330.
- BAILEY, D.R. (1970). Qd. J. agric. Anim. Sci. 27, 395-400. Tomado de: Herbicides Ed. AUDUS, L.J. Acad. Press. 1976. Cap. 14, pág. 393-445.
- BAMBERGER, E.S., BLACK, C.C., FEWSON, C.A. y GIBBS, M. (1963). Inhibition studies on carbon dioxide fixation, ATP formation, TPN reduction by spinach, chloroplasts. Plant. Physiol. 33, 433-437.
- BAUNOK, I. y GEISSBÜHLER, H. (1968). Bull Environ. Contam and Toxicol. 3, 7-17. Tomado de: Herbicides Ed. AUDUS, L.J. Acad. Press. 1976. Cap. 14, pág. 393-445.
- BEARDEN, A.J. y MALKIN, R. (1972). Quantitative EPR studies of the primary reaction of photosystem I in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 283, 456-463.



- BIDWELL, R.G.S. (1974). Plant. Physiology. Edited by
McMillan Publishing Co. Inc. New York.
- BIROS, F.J. (1971). Recent applications of mass spec-
trometry and combined gas chromatography-mass
spectrometry to pesticide residue analysis.
Residue Rev. 40, 1-63.
- BISHOP, N.I. (1958). The influence of the herbicide -
DCMU, on the oxygen evolving system of photo--
synthesis. Biochem. et Biophys. Acta 27, 205-
206.
- BLACKMAN, G.E. (1952). Studies in the Principles of
Phytotoxicity. I. The assessment of relative -
toxicity. J.exp. Bot. 3, 1-27.
- BLINN, R.C. (1971). En: Advances in Chemistry Series.
NR 104, pág. 81-94. American Chemical Society,
Washington, D.C.
- BOARDMAN, N.K. (1970). Physical separation of the pho-
tosynthetic photochemical systems. Ann. Rev. -
Plant. Physiol. 21, 115.
- BOARDMAN, N.K. (1975). Trace elements in photosynthe-
sis. En: Trace elements in soil/plant/animal/
systems, pág. 64-104. Eds. D.J.D. Nicholas y
A.R.Egem. Academic Press. London.
- BÖHME, C. y ERNST, E. (1965). Stoffwechsel von Harn-
stoff-Herbiciden in der Ratte. 2-Mitteilung.
Diuron und Afralon. Food Cosmet. Toxicol. 3,
797.
- BRIAN, R.C. (1976). The history and classification of
herbicides. En: Herbicides, vol. I, cap. I, págs.
1-50. Ed. AUDUS, L.J. Academic Press.

- BRODIE, B.B., GILLETTE, J.R. y LADU, B.N. (1953). Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 22, 427.
- BUCHA, H.C. y TODD, C.W. (1951). 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea, a new herbicide. *Science* 114, 493-494.
- CALVIN, M. (1956). The photosynthetic carbon cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 1895.
- CALVIN, M. (1962). The path of carbon in photosynthesis. *Science*, 135, 379-389.
- CALVIN, M. y BASSHAM (1962). The photosynthesis of carbón compounds, pág. 64-104. Benjamin Pub. New York.
- CHEMIAE, G.M. (1970). Photosystem II and O_2 evolution. *A. Rev. Pl. Physiol.* 21, 45-63.
- CHEMIAE, G.M., MARTIN, I.F. (1973). Absence of oxygen evolving capacity in dark grown *Chlorella*: the photoactivation of oxygen evolving centers. *Photochem. and Photobiol. C.D.* 17, no 6, 441-459.
- CHO, K.Y., TCHAN, Y.T. y LO, E.H.M. (1972). Soil Biology, 16, 13-21. Tomado de: Herbicides Ed. AUDUS, L.J. Acad. Press. 1976, Cap. 14, pág. 393-445.
- CHRISTOPH, R.J. y FISK, E.L. (1954). Responses of plants to the herbicide 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (CMU). *Bot. Gaz.* 116, 1-14.
- CIPAC Handbook, vol. I (1970). Ashworth, R. Deb, Henriett, J., Lovett, J.F. G.R. Raw ed.) CIPAC Ltd. Harpenden, U.K.
- COHEN, I.C. y WHEALS, B.B. (1969). An electron capture gas chromatographic method for the determination of substituted urea and carbamate herbicides as





- 2,4-Dinitrophenyl derivatives of their auxine moities. J. Chromat. 43, 233-240.
- COOKE, A.R. (1955). Effect of CMU on the biochemical composition of several legumes. North Central Weed Control Conf. Res. Rept. págs. 181-182.
- COOKE, A.R. (1956). A possible mechanism of action of the urea-type herbicides. Weeds, 4, 397-398.
- COULSON, D.M., CAVANAGH, L.A. y STUART, J. (1959). Gas Chromatography of Pesticides. J. Agric. Fd. - Chem. 2, 250-251.
- CRAFTS, A.S. (1935). Hilgardia, 2, 461-498. Tomado de: Herbicides Ed. AUDUS, L.J. Acad. Press 1976, - cap. 14, págs. 393-445.
- CRAFTS, A.S. (1959). Further studies on comparative mobility of labeled herbicides. Plant physiol. 34, 613-620.
- CRAFTS, A.S. (1962). Use of labeled compounds in herbicide research. Intern. J. Appl. Radiation Isotopes, 13, 407-415.
- CRAFTS, A.S. (1967). Bidirectional movement of labeled tracers in soybean seedlings. Hilgardia, 37, 625-638.
- CRAFTS, A.S. y YAMAGUCHI, S. (1958). Comparative tests on the uptake and distribution of labeled herbicides by Zebrina pendula and Tradescantia fluminensis. Hilgardia, 27, 441-454.
- CRAFTS, A.S. y YAMAGUCHI, S. (1960). Absorption of herbicides by roots. Am.J.Bot., 47, 243-255.
- DALTON, R.L. y PEACE, H.L. (1962). Determination of Residues of Diuron, Monuron, Fenuron and Neburon. J.Ass. off. agric. Chem. 45, 377-381.



- DAVIDSON, J.M., RIECK, C.E. y SANTELMANN, P.W. (1968). Quantitative extraction of Fluometuron from water samples by n-pentane. *Weed Sci.* 16, 334-354.
- DAVIS, E.A. (1966). The role of starvation in fenuron injury to shrub live oak. *Weeds*, 14, 10-17.
- DAY, B.E. (1955). Urea herbicides for citrus weed control. *Calif. Citrog.* 40, 398-414.
- DETROUX, L. (1966). Review of current Belgian work on post-emergence treatments in Sugar Beet, 34 Brit. Weed Cont. Cong. pág. 20-25. Brighton.
- DETROUX, L. y GOSTINCHAR, J. (1967). Los herbicidas y su empleo, págs. 320-325. Edit. Oikos-tau.
- DONALDSON, T.W. (1967). Absorption of the herbicides 2,4-D and monuron by barley roots. Ph. D. Thesis Univ. Calif., Davis, 124 págs.
- DOWLER, C.C. (1969). A Cucumber Bioassay Test for the soil residues of certain herbicides. *Weed Sci.* 17, 309-310.
- DUGGAN, R.E. (ed.) (1969). Pesticide Analytical Manual. Vol. I, sect. 140-2. F.D.A. Dep. Hew. Washington, D.C. USA.
- DUYSENS, L.N.M. y AMESZ, J. (1962). Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 64, 245-260.
- EL-DIB, M.A. (1970). Thin layer chromatographic detection of Carbanate and Phenylurea pesticide residues in natural waters. *J. Ass. off analyt. Chem.* 53, 756-760.



- EMERSON, R. (1958). Yield of photosynthesis from simultaneous illumination with pairs of wavelengths. *Science*, 127, 1059-1060.
- ERCEGOVICH, C.D. y WITKONTON, S. (1972). An improved method for the analysis of residues of Isopropyl N-(3-Chlorophenyl)carbamate (Chlorpropham) in Alfalfa. *J. Agric. Fd. Chem.* 20, 344-347.
- ERNST, W. y BÖHME, C. (1965). Über den stoffwechsel von Harnstoff-Herbiciden in der Ratte. 1 Mitteilung, Monuron und Aresin. *Food Cosmet. Toxicol.* 3, 797.
- FANG, S.C., FREED, V.H., JOHNSON, N.H. y COFFEE, D.R. (1955). Absorption, translocation, and metabolism of radioactive 3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethyl-urea (DMU) by bean plants. *J. Agric. Food Chem.* 3, 400-402.
- FERNANDEZ, J. (1975). A simple laboratory-field system to determine photosynthetic activity in plants with $^{14}\text{CO}_2$. VI Reunión anual de ESNA (European Society of nuclear methods in Agriculture).
- FERNANDEZ, J. (1978). A simple system to determine photosynthesis in field conditions by means of $^{14}\text{CO}_2$. *Photosynthetica* 12(2), 145-149.
- FREED, V.H., MONTGOMERY, M. y KRIEF, M. (1961). The metabolism of certain herbicides by plants - a factor in their biological activity. *Proc. Northeast. Weed Control Conf.* 15, 6-16.
- FREI, R.W., LAWRENCE, J.F. y LE GAY, D.S. (1973). The analysis of carbamate and urea herbicides by - fluorimetry of their densylated amine moieties. *Analyst. Lond.* 98, 9-13.
- FRYER, J.D. y KIRKLAND, K. (1970). Field experiments to investigate long-term effects of repeated -

applications of MCPA tri-allate, simazine and Linuron: report after 6 years. *Weed Res.* 10, 133-158.

FUKEL'MAN, L.M. y VOL'MAN, L.B. (1968). *Khimiya sel'*. Khoz. 6, 65-69. Tomado de: *Herbicidas*, cap. 14, pág. 393-445. Ed. AUDUS, L.J. Acad. Press 1976.

GARCIA, J.R. (1972). Estudio de la inhibición de la fotosíntesis por el monurón en diversas especies de plantas cultivadas y metodología para la determinación de residuos utilizando trazadores radiactivos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid.

GAUDEWTE, L.E. y BRODIE, B.B. (1959). *Biochem. Pharmacol.* 2, 39. Tomado de: *Degradation of herbicides*. Cap. 3, pág. 105 "The substituted ureas", by Hans Geissbühler. Ed. Kearney Kaufman. Marcel Dekker, Inc. 1969.

GEISSBÜHLER, H. (1969). En: *Degradation of herbicides* pág. 79-111. Ed. Kearney Kaufman. Marcel Dekker Inc.

GEISSBÜHLER, H. y GROSS, D. (1967). Specific detection of urea herbicide residues by separation of their amines on cellulose thin-layer plates. *J. Chromat.* 27, 296-199.

GEOGHEGAN, M.J. (1957). The effect of some substituted methylureas on the respiration of *Chlorella vulgaris* var. *viridis*. *New Phytol.* 56, 71-80.

GINGRAS, G. (1966). Etude comparative, chez quelques algues, de la photosynthèse et de la photoréduction réalisée en présence d'hydrogène. *Physiol. vég.* 4, 1-65.



GINGRAS, G., LEMASSON, C. y FORK, D.C. (1963). A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. Notas preliminares. Biochem. Biophys. Acta, 69, 438-440.

GINGRAS, G. y LEMASSON, C. (1965). A study of the mode of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on photosynthesis. Biochem. Biophys. Acta, 109, 67-78.

GRAMLICH, J.R. y FRANS, R.E. (1964). Kinetics of Chlorella inhibition by herbicides. Weeds, 12, 184-189.

GRANT, W.F. (1964). Cytogenetic effects of pesticides. Rech. Agron. 65, 10-23.

GUARDIGLI, M., CHOW, Y. y LEFAR, M.S. (1971). Determination of some Acidic Herbicides by Thin-layer Chromatography. J. agric. Ed. Chem. 19, 1131-1132.

HALL, D.O. y RAO, K.K. (1972). Photosynthesis. Ed. Arnold. London.

HANCE, R.J. y McKONE, C.E. (1976). The determination of herbicides. En: Herbicides, vol. 1, Ed. AUDUS, L.J. Academic Press, pág. 393-445.

HAUN, J.R. y PETERSON, J.H. (1954). Translocation of 3-(p-chlorophenyl)-1,1 dimethylurea in plants. Weeds, 3, 177-187.

HILL, R. (1937). Oxygen evolved by isolated Chloroplasts. Nature, 139, 881-882.

HILL, R. (1939). Oxygen produced by isolated Chloroplasts. Proc. Roy. Soc. B. 127, 192-210.

HILL, R. y BENDALL, F. (1959). Function of the two cytochrome components in Chloroplasts: a working hypothesis. Nature, 186, 136-137.

- HODGE, H.C. y col. (1958). AMA, Arch. In. Health 17, 45-47. Tomado de la Información sobre el monu--
rón publicada por la firma E.I. du Pont de Ne--
mours. Wilmington, Delaware 19393. Abril 1965.
- HODGSON, E. y CASIDA, J.E. (1961). Biochem. Pharmacol. 8, 179. Tomado de: Degradation of herbicides.
Cap. 3. The substituted ureas, by Hans Geiss--
bühler, pág. 105. Ed. Kearney Kaufman. Marcel
Dekker, Inc. 1969.
- HOMANN, P. y GAFFRON, H. (1963). Flavin sensitized pho--
toreactions: effects of 3-(p-chlorophenyl)-1,1--
dimethylurea. Science, 141, 905-906.
- HORSCHITZ, M. (1970). Notes on bioassay techniques for
several soil-applied substituted ureas. Israel
J. Agric. Res. 22, 77-85.
- IZAWA, S. (1963). Effect of Hill reaction inhibitors
on photosystem I, pág. 140-147. En: K. Shibata,
A., Takanya, A. T., Jagendorf y R.R. Fuller. Ed.
Comparative Biochemistry and Biophysics of Pho--
tosynthesis. Univ. of Tokyo. Press, Tokyo, and
Univ. Park Press, State College, Penn.
- IZAWA, S. y GOOD, N.E. (1965). The number of sites sen--
sitive to 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diethyl--
urea, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-diethylurea and
2-chloro-4-(2-propylamino)-6-ethylamino-S-tri--
azine in isolated chloroplasts. Biochim. Bio--
phys. Acta, 102, 20-33.
- JAGENDORF, A.T. y AVRON, M. (1959). Inhibitors of pho--
tosynthetic phosphorylation. Arch. Biochem. and
Biophys. 30, 246-257.
- JORDAN, L.S., MURASHIGE, T., MANN, J.D. y DAY, B.E. -
(1966). Effect of photosynthesis-inhibiting -

- herbicides on non-photosynthetic tobacco callus tissue. *Weeds*, 14, 134-136.
- KEITH, L.H. y ALFORD, A.L. (1970). Review of the application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Pesticide Analysis. *J. Ass. off analyt. Chem.* 53, 1018-1035.
- KIRKLAND, J.J. (1969). High-speed liquid chromatography with controlled surface porosity supports. *J. Chromat. Sci.*, 7, 7-12.
- KIRKLAND, J.J. (ed.) (1971). *Modern Practice of liquid chromatography*. Willey-Interscience, New York.
- KNAFF, D.B. y ARNON, D.I. (1969). A concept of three - light reactions in photosynthesis by green plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 963-969.
- ROSCHE, K. (1971). *Proc. 2nd. int. IUPAC Cong. Pesticide Chemistry, Israel*, vol. IV, 555-565.
- KOUCHKOUSKY, Y. (1963). La pluralité des réactions photochimiques en photosynthèse. *Physiologie Vege.* 1, 4, 325-357.
- KRATKY, B.A. y WARREN, G.F. (1971 a). A rapid bioassay for photosynthetic and respiratory inhibitors. *Weed Sci.*, 19, 658-661.
- KRATKY, B.A. y WARREN, G.F. (1971 b). The use of three simple, rapid bioassays on forty-two herbicides. *Weed Res.* 11, 257-262.
- KROGMANN, D.W. (1958). Oxidative photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 655-656.
- KUHL, A. y LORENZEN, H. (1964). Handling and culturing of *Chlorella*. Cap. 10, pág. 159-187. En: *Methods in Cell Physiology*. Ed. by David M. Prescott, vol. 1 (1964).

- KYLIN, A., SUNDBERG, I. y TILLBERG, J.E. (1972). Titration with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) as evidence for several photophosphorylation sites in *Scenedesmus*. *Physiol.Plant.* 27, 376-383.
- LEONARD, O.A., LIDER, L.A. y GLENN, R.K. (1966). Absorption and translocation of herbicides by Thompson seedless (Sultatrine) Grape, *Vitis vinifera*. *Weed Res.* 6, 37-49.
- LOOK, M. y WHITE, L.R. (1970). A chromogenic agent for detecting dimethylurea herbicides on thin-layer chromatographic plates. *J.Chromat.* 50, 145.
- LORENZEN, H. (1956). Über Wachstum und Stoffwechsel von Grünalgen mit besonderer Berücksichtigung der räumlichen Abgrenzung der Assimilation. *Planta*, 48, 1-14.
- LORENZEN, H. (1957). Synchrone Zellteilungen von *Chlorella* bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. *Flora*, 144, 473-496.
- LOSADA, M. WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. (1961). Separation of two light reactions in non cyclic photophosphorylation of green plants. *Nature*, 190, 606-610.
- LOTLIKAR, P.D., REMMERT, L.F. y FREED, V.H. (1963). Effects of 2,4 D and other herbicides on oxidative phosphorylation in mitochondria from cabbage. *Weed Sci.* 16, 161-163.
- LOWEN, W.K., BLEIDNER, W.E., KIRKLAND, J.J. y PEASE, H.L. (1964). Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth regulators and Food Additives. Vol. IV. Academic Press, págs. 157-160.
- MAJOR, A. (1962). Screening Method for Monuron, Diuron and Heburon residues on fruits and vegetables by



paper chromatography. J. Ass. off agric. Chem. 45, 337-390.

MAKEEVA-GUR'YANOVA, L.T. y CHKANIKOV, D.I. (1963). More data on the effect of urea-derivative herbicides on photosynthetic processes. Agroknimiya 5, 93-98.

MALONEY, T.E. (1958). Control of algae with chlorophenyl dimethylurea. J. Almer. Water Works Assoc. 50, 417-422.

MAZUR, A.R., JAGSCHITZ, J.A. and SKOGLEY, C.R. (1969). Bioassay for bensulide, DCPA and siduron in turf grass. Weed Sci. 17, 31-34.

MCCALL, G.L. (1952). "CMU", a new herbicide. Agric. - Chem. 2, 40-41, 127-128.

MITCHELL, L.C. (1966). Inhibition of the formation of photosynthetic enzymes by inhibitors of photosynthesis. Plant Physiol. 43, 188-192.

MINSHALL, W.H. (1954). Translocation path and place of action of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea in bean and tomato. Canad. J. Bot. 32, 795-798.

MINSHALL, W.H. (1957). Primary place of action and symptoms induced in plants by 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Canad. J. Plant. Sci. 37, 157-166.

MINSHALL, W.H. (1960). Effect of 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on dry matter production, transpiration and root extension. Canad. J. Bot. 38, 201-216.

MITCHELL, L.C. (1966). Separation and identification of substituted urea herbicides by paper chromatography. J. Ass. off. analyt. Chem. 43, 1163-1166.

- MORELAND, D.E. (1967). Mechanism of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 18, 365-406.
- MORELAND, D.E. y BLACKMON, W.J. (1968). Comparative action of herbicides on electron transport and phosphorylation in mitochondria and chloroplasts. *Abstr. Pop. 156th Meet. Am. Chem. Soc.* AGFD-74.
- MURRAY, D.S., RIECK, W.L. y LYND, J.S. (1969). Microbial degradation of five substituted urea herbicides. *Weed Sci.* 17, 52-55.
- MUZIK, T.J., CRUZADO, H.J. y LOUSTALOT, A.J. (1954). Studies on the absorption, translocation and action of GUN. *Bot. Gaz.* 116, 65-73.
- SHIM, J.H. y ZIP, E. (1969). Analysis of a simple crop screen for substituted urea herbicides and substituted thiocarbamates. *J. Agr. Sci. Camb.* 52, 529-532.
- OSWIECINSKA, H. y GOLCZ, B. (1969). *Farmacja pol.* 22, 123-124. Tomado de: *Herbicides*. Ed. AUDUS, L. J. Acad. Press 1976, cap. 14, pág. 393-445.
- PARKER, C. (1964). *Proc. 7th Br. Weed Control Conf.* pág. 899-902.
- PARKER, C. (1965). A rapid bio-assay method for the detection of herbicides which inhibit photosynthesis. *Weed Res.* 5, 181-184.
- PEREIRA, J.F., CRAFTS, A.S. y YAMAGUCHI, S. (1965). Translocation in coffee plants. *Turrialba*, 15, 64-79.
- PICKERING, E.R. (1965). Foliar penetration pathways of 2,4-D, monuron and dalapon as revealed by autoradiography. Ph. D. Dissertation Uni. Calif. Davis, 186 págs.



POSNER, H.S., MITOMA, Ch., ROTHBERG, S. y UDENFRIED, S. (1961). Enzymic Hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. 94, 280.

PRIDHAM, J.B. (1965). Low molecular weight phenols in higher plants. Ann.Rev.Plant.Physiol. 16, 13.

RAY, B.R. y WILCOX, M. (1967). Separation of alkyl and trimethylsilyl derivatives of Dicamba, 3,6-dichloro-5-hydroxy-O-anisil acid, and 3,6-dichlorogentisic acid by thin-layer and gas-liquid chromatography. J. Chromat. 30, 428-432.

RENGER, G. (1977). Theoretical studies about the functional and structural organization of the photosynthetic system evolution. (Max Volmer Inst. Phys. Chem. Molekularbiol. Tech. Univ. 12, Berlin, Fed. Rep. Ger.). Photosynth. Oxygen. Evol. (Symp). (Pub. 1973). 229-48. Edited by Metzner H. Academic London Engl.

RURAINSKI, H.J. (1975). Antagonistic relationships between electron transport and P700 in Chloroplasts and intact algae. Z. Naturforsch. C. 30, 6, - 761-770.

SAMPFORD, M.R. (1952). Studies in the Principles of Phytotoxicity. II. Experimental designs and techniques of statistical analysis for the assessment of toxicity. J. cap. Bot. 3, 23-46.

SANCHO, C. (1975). Estudio comparativo de la inhibición que produce el CMU [3-(p-clorofenil)-1,1-dimetilurea] sobre la fotofosforilación, fotocarboxilación y reacción de Hill en hojas de plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.). Memoria de Licenciatura en Ciencias. Universidad de Madrid.



- SANTELMAUN, P.W., WAHER, J.B. y WIESE, A.F. (1971). A study of soil bioassay technique using prometryne. *Weed Sci.* 19, 170-174.
- SARGENT, D.F. y TAYLOR, C.P.S. (1972). Light induced inhibition of respiration in DCMU-poisoned *Chlorella* caused by photosystem I activity. *Canad. J. Bot.* 50, 1, 13-21.
- SHUSTER, L. (1964). Metabolism of drugs and toxic substances. *Ann. Rev. Biochem.* 33, 571.
- SIKKA, H.C. y DAVIS, D.E. (1966). Dissipation of atrazine from soil by corn, sorghum and Johnsongrass. *Weeds*, 14, 289-293.
- SMITH, H. (1977). The molecular biology of plant cells. *Botanical monographs*, vol. 14, pag. 94. Blackwell Scientific Publications.
- SMITH, J.W. y SHEETS, T.J. (1966). Uptake, distribution and metabolism of diuron and monuron by soybean and cotton. *WS3A. Abstr.* pag. 39.
- SMITH, J.W. y SHEETS, T.J. (1967). Uptake, distribution and metabolism of monuron and diuron by several plants. *J. Agr. Food Chem.* 15, 577-581.
- SMITH, A.E. y FITZPATRICK, A. (1971). A thin-layer - chromatographic procedure for the detection in soils and waters of herbicide residues commonly used in saskatchewan. *J. Chromat.* 52, 303-308.
- Standard methods for the examination of water and waste water 13th edition (1973).
- STECKÓ, V. (1971). *Inst. p. växtodling*, Lantbr Högsk. Uppsala, Sweden, 1-97 (informe mikrografado).
- STUART, T.S. y GAFFRON, H. (1972 a). The mechanism of hydrogen photoproduction by several algae. I.



The effect of inhibitors of photophosphorylation in
Planta, 106, nº 2, 91-100.

STUART, T.S. y GAFFRON, H. (1972 b). The mechanism of
hydrogen photoproduction by several algae. II.
The contribution of photosystem II. Planta Alem.
106, nº 2, 101-112.

SUNIDA, S., UEDA, M. (1973). Studies of pesticide ef-
fects on Chlorella metabolism. I. Effect of her-
bicides on complex lipid biosynthesis. Plant.
Cell Physiol, 14, nº 4, 781-785.

SUNNER, J.B. y SOMERS, G.F. (1955). Chemistry and -
Methods of Enzymes. Acad. Press. New York, 3rd
ed.

THOMPSON, I. y MILLER, A. (1972). Titration of Photo-
phosphorylation in Spinach Chloroplasts with
3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU).
Physiol. Plant. 27, 384-388.

SWANSON, C.R. y SWANSON, H.R. (1968). Metabolic fate
of monuron and diuron in isolated leaf discs.
Weed Sci. 16, 137-143.

SWEETSER, P.B. (1963). Photoinactivation of monuron,
3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea by ribo--
flavin-5-phosphate. Biochim. Biophys. Acta, 66,
73.

SWEETSER, P.B. y TODD, C.W. (1961). The effect of mo-
nuron on oxygen liberation in photosynthesis.
Biochim. et Biophys. Acta, 51, 504-508.

TEICHLER-ZALLEN, D. y HOCH, G.E. (1967). Cyclic elec-
tron transport in algae. Arch. Biochem. Biophys
120, 227-228.

THOMSON, W.T. (1972). Agricultural chemicals Book II. Her-
bicides, 1972 revision. Thomson pub. Indiana, p. 136-
138.

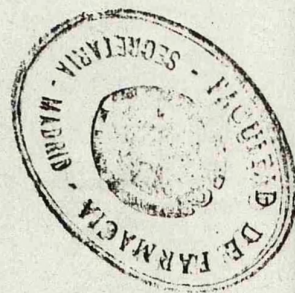
- THOMPSON, H.E., SWANSON, C.P. y NORMAN-BOTAN, A.G. (1946). New growth-regulating compounds. I. Summary of growth-inhibitory activities of some organic compounds. Bot.Gaz. 107, 476-507.
- VIERKE, G. (1979). Determination of the kinetics of the back reaction of photosystem II in the presence of 3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea from luminescence measurements. Photochem. Photobiol. 29 (3), 597-604.
- VODERBERG, K. (1961). The dependence of herbicide action on root growth different plants, an external factor. Nachrbl. dtsh. Pflsch Dnst. 15, 68-70.
- WAGNER, G. y REISSBÜHLER, H. (1971). Proc. 2nd int. IUPAC Congr. Pesticides Chemistry, Israel, vol. IV, - págs. 523-536.
- WALSH, G.E. y GROW, T.E. (1971). Depression of carbohydrate in marine algae by urea herbicides. Weed Sci. 19, 566-570.
- WARBURG, O. (1919). Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezerersetzung in lebenden Zellen. Biochem. Z. 100, 230-270.
- WEED CONTROL MANUAL AND HERBICIDE GUIDE (1971). Published by Meister Publishing Company. Willoughby, Ohio, 44094.
- WESSELS, J.S. y VAN DER VEEN, C. (1956). The action of some derivatives of phenyluretan and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. Biochim. Biophys. Acta. 12, 543-549.
- WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. (1963). Photosynthetic phosphorylation in plant. En: Methods in enzymology S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Eds.), vol. 1, págs. 303-313. Academic Press, N.Y.

- WINKLER, W. (1965). Standard Methods for the examination of water, sewage and industrial wastes. Winkler Method unmodified. (American Public Health Association, New York, 12th ed.), pág. 252-255.
- WUU, K.D. y GRANT, W.F. (1966). Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in barley (*Hordeum vulgare*). Can. J. Genet. Cytol. 8, 481-501.
- YAMAGUCHI, S. e ISLAM, A.S. (1967). Translocation of eight ^{14}C -labeled aminoacids and three herbicides in two varieties of barley. Hilgardia, 38, 207-229.
- YIP, G. y HOWARD, S.T. (1966). Thin layer chromatography of chlorophenol pesticides. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 1166-1169.
- YOUNG, H.V. y GORTNER, W.A. (1953). Microdetermination of 5-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea in plant tissue. Analyt. Chem. 25, 800-802.
- ZIMMERMAN, P.W. y HITCHCOCK, A.E. (1942). Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. Contribs. Boyce Thompson Inst. 12, 321.
- ZWEIG, G. (ed.) (1964). Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives. Vol. IV, Academic Press, New York and London.
- ZWEIG, G. (ed.) (1967). Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives. Vol. V, Academic Press, New York and London.

ZWEIG, G. y ARCHER, T.E. (1960). Quantitative determination of thiodan by gas chromatography. J.Agr. Fd. Chem. 3, 190-192.

ZWEIG, G. y SHERMA, J. (1972). Analytical methods for pesticides and plant growth regulators. Vol.VI. Gas chromatographic analysis (G. Zweig ed.), - Academic Press, New York and London.





ANEXO I

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ANEXO I

Abreviaturas y símbolos

Compuestos

- ADP : Adenosin - 5' - difosfato
- ATP : Adenosin - 5' - trifosfato
- bFd : Ferredoxina ligada (bound Ferredoxin)
- CMU : Monurón 3 - p(clorofenil)-1,1-dimetilurea
- DCMU : Diurón 3 - (3,4 diclorofenil)1,1-dimetilurea
- DPIP : 2,6 - diclorofenol indofenol
- Fd : Ferredoxina
- FMN : Flavin mononucleótido
- NADP : Nicotin - adenin - dinucleótido fosfato
- PC : Plastocianina
- PGA : Acido fosfoglicérico
- Pi : Ortofosfato (inorgánico)
- PQ : Plastoquinona
- RuDP : Ribulosa - 1,5 - difosfato



Unidades y magnitudes

- bq : Becquerelio (desintegración por segundo)
- C : Concentración
- $^{\circ}\text{C}$: Grado centigrado
- Ci : Curio. Es la antigua unidad de actividad y representa la cantidad de material radiactivo en el que ocurren $2,22 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto, la cual ha sido sustituida por el bq.
- ΔG : Incremento de la energía libre
- DL₅₀ : Dosis letal media
- D.O. : Densidad óptica
- dpm : Desintegración por minuto
- E₀ : Potencial normal

Varios

- A.F. : Actividad fotosintética
- A_{Fr} : Actividad fotorreductora
- A_s : Actividad específica
- c.l. : Centelleo líquido
- e : Eficiencia del contaje
- PS-I : Fotosistema I
- PS-II : Fotosistema II



ANEXO II

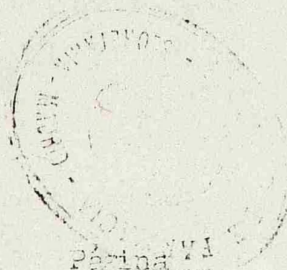
INDICE DE TABLAS



ANEXO II

Indice de Tablas

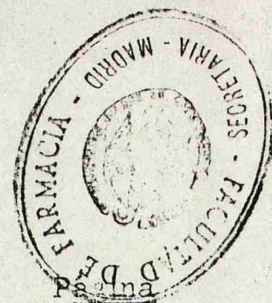
	<u>Página</u>
I - Solubilidad del CMU en diferentes disolventes	5
II - N-dealquilación e hidrólisis del CMU- ¹⁴ C después de la aplicación del compuesto marcado a diferentes especies vegetales..	28
III - Principales plantas cultivadas en las que se utiliza el CMU como herbicida	34
IV - Sensibilidad de algunas especies de malas hierbas al CMU	35
V - Composición de la solución nutritiva de Bidwell	52
VI - Concentración radiactiva de las diferentes soluciones de CMU- ¹⁴ C	56
VII - Componentes añadidos a cada cubeta según tratamiento	69
VIII - Composición de las soluciones stock del Dr. Rodríguez López para el cultivo del alga Chlorella	76
IX - Solubilidad del oxígeno en el agua saturada de aire y en solución tampón de CO ₃ H Na/CO ₃ Na ₂ 0,1 M (85:15)	39
X - Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de cebada por tratamiento crónico .	96



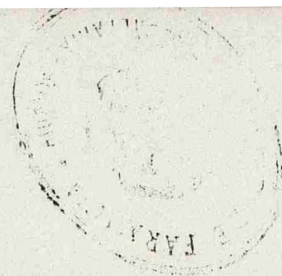
XI	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de cebada por tratamiento agudo	97
XII	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de avena por tratamiento cró- nico	98
XIII	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de avena por tratamiento agudo..	99
XIV	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de trigo por tratamiento crónico	100
XV	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de trigo por tratamiento agudo ..	101
XVI	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de maíz por tratamiento crónico.	102
XVII	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de maíz por tratamiento agudo .	103
XVIII	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de judía por tratamiento crónico.	104
XIX	- Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de judía por tratamiento agudo ..	105

	<u>Página</u>
XX - Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de tomate por tratamiento crónico	106
XXI - Efecto del CMU sobre la aparición de hojas y síntomas de marchitamiento en plántulas de tomate por tratamiento agudo	107
XXII - Concentración de CMU en las hojas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y toma te después de 24 horas de absorción ra- dicular en soluciones con diferentes con- centraciones de CMU	109
XXIII - Concentración de CMU en las hojas de cebada, avena, trigo, maíz, judía y toma te después de 7 días de absorción radicu- lar en soluciones con diferentes concen- traciones de CMU	110
XXIV - Relación de la concentración de CMU al- canzada en las hojas de las diferentes plantas respecto a la concentración exis- tente inicialmente en la solución nutri- tiva	111
XXV - Efecto de la absorción radicular de CMU durante 24 horas sobre la actividad fo- tosintética de las hojas de las diferen- tes plantas tratadas	121
XXVI - Efecto de la absorción radicular de CMU durante 7 días sobre la actividad foto- sintética de las hojas de las diferentes plantas tratadas	122

	<u>Página</u>
XXVII - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de cebada y la actividad fotosintética relativa de la misma	123
XXVIII - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de avena y la actividad fotosintética relativa de la misma.	124
XXIX - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de trigo y la actividad fotosintética relativa de la misma.	125
XXX - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de maíz y la actividad fotosintética relativa de la misma.	126
XXXI - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de judía y la actividad fotosintética relativa de la misma.	127
XXXII - Relación entre la concentración de CMU alcanzada en la hoja de tomate y la actividad fotosintética relativa de la misma.	128
XXXIII - Contenido en clorofila de las hojas de las diferentes especies ensayadas y su relación con el contenido en clorofila de la suspensión de cloroplastos en el estudio de la reacción de Hill	132
XXXIV - Curva de calibrado del DPIP oxidado	133
XXXV - Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de cebada en función de la concentración de CMU	135



XXXVI - Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de avena en función de la concentración de CMU	136
XXXVII-Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de trigo en función de la concentración de CMU	137
XXXVIII-Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de maíz en función de la concentración de CMU	138
XXXIX - Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de judía en función de la concentración de CMU	139
XL - Reacción de Hill en cloroplastos aislados de hojas de tomate en función de la concentración de CMU	140
XLI - Relación entre la concentración de CMU en la cubeta de reacción y la actividad fotosintética relativa expresada en % .	142
XLII - Correlación existente entre la capacidad fotorreductora de los cloroplastos (reacción de Hill) de las diversas especies vegetales y la concentración de CMU	143
XLIII - Efecto del CMU sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	151
XLIV - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de cebada, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	154



Página

- XLV - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de avena, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella 155
- XLVI - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de trigo, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella 156
- XLVII - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de maíz, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella 157
- XLVIII - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de judía, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella 158
- XLIX - Curva de calibrado para la evaluación del contenido de CMU en el extracto de hojas de tomate, teniendo en cuenta el efecto sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella 159
- L - Correlación existente entre la capacidad fotosintética de Chlorella pyrenoidosa y la concentración de CMU en extractos de hojas de las diversas especies vegetales. 160

LI	- Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	169
LII	- Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	170
LIII	- Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	171
LIV	- Efecto del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	172
LV	- Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	173
LVI	- Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 24 h, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga Chlorella	174

- LVII - Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 175
- LVIII - Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 176
- LIX - Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 177
- LX - Efecto del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 178
- LXI - Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 179
- LXII - Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 180

- LXIII - Efecto del extracto de hojas de plantas de cebada que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* 182
- LXIV - Efecto del extracto de hojas de plantas de avena que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* .. 183
- LXV - Efecto del extracto de hojas de plantas de trigo que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* .. 184
- LXVI - Efecto del extracto de hojas de plantas de maíz que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* .. 185
- LXVII - Efecto del extracto de hojas de plantas de judía que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana, y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* .. 186

- LXVIII-Efecto del extracto de hojas de plantas de tomate que absorbieron radicularmente distintas concentraciones de CMU durante 1 semana y la semana posterior solución nutritiva sólo, sobre la actividad fotosintética y respiratoria del alga *Chlorella* .. 187
- LXIX - Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de cebada después de diferente tiempo de absorción radicular ... 189
- LXX - Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de avena después de diferente tiempo de absorción radicular ... 190
- LXXI - Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de trigo después de diferente tiempo de absorción radicular ... 191
- LXXII - Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de maíz después de diferente tiempo de absorción radicular 192
- LXXIII-Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de judía después de diferente tiempo de absorción radicular 193
- LXXIV - Concentración estimada de CMU en las hojas de plantas de tomate después de diferente tiempo de absorción radicular ... 194
- LXXV - Efecto comparativo de la inhibición de la actividad fotosintética (AF) por diversas concentraciones de CMU en fragmentos de cloroplastos (Reacción de Hill) y en hojas de plantas tratadas durante 24 horas 215

LXXVI - Efecto comparativo de la inhibición de la Actividad fotosintética (AF) por diversas concentraciones de CMU en fragmentos de cloroplastos (Reacción de Hill) y en hojas de plantas tratadas con CMU durante 7 días	214
LXXVII-Comparación de la A.F. relativa al t ₅₀ obtenido en Chlorella (método polarográfico) y cloroplastos de diversas especies (Reacción de Hill) tratadas con diversas concentraciones de CMU	219
LXXVIII-Efecto de diversas concentraciones de CMU sobre el desprendimiento de O ₂ en suspensiones de Chlorella pyrenoidosa con extractos de hojas procedentes de diversas especies vegetales	221



ANEXO III

INDICE DE FIGURAS

ANEXO III

Indice de Figuras

	<u>Página</u>
1 - Esquema en Z del transporte electrónico fotosintético	17
2 - Posible vía de degradación del CMU en plantas superiores	31
3 - Disposición de las plantas en solución nutritiva	51
4 - Preparación del aire marcado con $^{14}\text{CO}_2$.	60
5 - Esquema de la microcámara utilizada para la medida de la actividad fotosintética en hojas de diversas plantas cultivadas	61
6 - Esquema del proceso de aislamiento de fragmentos de cloroplastos en hojas de plantas cultivadas	66
7 - Conjunto de baño y sistema de iluminación para el estudio de la actividad fotosintética en cloroplastos aislados .	71
8 - Dispositivo para el cultivo sincrónico de <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	79
9 - Circuito eléctrico del electrodo de oxígeno	82
10 - Electrodo de oxígeno tipo Clarke	84
11 - Esquema del equipo completo	85
12 - Equipo completo del electrodo de oxígeno	87

Página

- 13 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de cebada que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 112
- 14 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de avena que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 113
- 15 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de trigo que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 114
- 16 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de maíz que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 115
- 17 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de judía que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 116
- 18 - Histograma de las concentraciones de CMU en las hojas de plantas de tomate que lo absorbieron radicularmente durante 24 horas y 7 días 117
- 19 - Relación entre la concentración de CMU en la solución y la concentración de CMU alcanzado en las hojas de las diferentes plantas después de absorberlo radicularmente durante 24 horas 118

20	- Relación entre la concentración de CMU en la solución y la concentración de CMU alcanzado en las hojas de las diferentes plantas después de absorberlo radicularmente durante 7 días	119
21	- Influencia de la concentración alcanzada por el CMU en las hojas de diferentes vegetales que lo absorbieron radicalmente durante 24 horas, sobre la actividad fotosintética de éstas	129
22	- Influencia de la concentración alcanzada por el CMU en las hojas de diferentes especies vegetales que lo absorbieron radicalmente durante 7 días, sobre la actividad fotosintética de éstas	130
23	- Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de cebada en función de la concentración de CMU	144
24	- Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de avena en función de la concentración de CMU	145
25	- Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de trigo en función de la concentración de CMU	146
26	- Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de maíz en función de la concentración de CMU	147
27	- Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de judía en función de la concentración de CMU	148

	<u>Página</u>
28 - Actividad fotorreductora (AFr) de los cloroplastos de tomate en función de la concentración de CMU	149
29 - Actividad fotosintética de Chlorella pyrenoidosa en función de la concentra- ción de CMU	152
30 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de cebada	162
31 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de avena	163
32 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de trigo	164
33 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de maíz	165
34 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de judía	166
35 - Actividad fotosintética de Chlorella py- renoidosa en función de la concentra- ción de CMU en extractos de hojas de tomate	167

